

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

LA THÉORIE DES MUTANTS SPONTANÉS EST-ELLE APPLICABLE A TOUS LES CAS DE CULTURES SECONDAIRES APRÈS BACTÉRIOPHAGIE ?

par PIERRE NICOLLE et M^{me} GILLES CONGE (*).

(Institut Pasteur, Service du Bactériophage.)

Certains bactériophages, assez rares à la vérité, sont capables, dans des conditions bien déterminées d'expérience, de dissoudre complètement et définitivement des cultures de bactéries sensibles. C'est le cas du bactériophage du bacille pesteux ou encore celui du bactériophage staphylococcique Twort (fig. 1).

Mais, avec la plupart des bactériophages, la lyse, parfois totale en apparence, plus fréquemment incomplète, est suivie d'une culture secondaire d'importance très variable (fig. 2). D'après d'Hérelle, le bactériophage provoquerait chez les bactéries qu'il a contaminées, mais qui ont réussi à résister à son action lytique, l'apparition de caractères nouveaux, parmi lesquels, très régulièrement, la phagorésistance, et moins constamment la lysogénéité. Le bactériophage serait donc un agent de « variations bactériennes », ou en langage moderne, de « mutations induites ».

Cette explication n'a pas été admise par tous les auteurs. A. Gratia dès 1921, J. Bordet en 1925, enfin F.-M. Burnet en 1929, soutinrent que, dans une culture de germes lysosensibles, il se

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 3 février 1949.

produirait, en dehors de l'intervention du bactériophage, des mutations de toutes sortes. Parmi les mutants spontanés ayant pris naissance, certains auraient la propriété de résister à l'action de tel bactériophage. Celui-ci, ajouté alors à la culture, en faisant disparaître les éléments sensibles de beaucoup les plus nombreux, laisserait le champ libre à la prolifération des mutants résistants et de leur descendance également résistante. C'est la théorie des mutants spontanés. Elle n'attribue, comme on le voit, au bactériophage, dans la formation des cultures secondaires, qu'un rôle de sélection. Une telle théorie est également valable pour les mutants résistants qui apparaissent dans les cultures soumises à

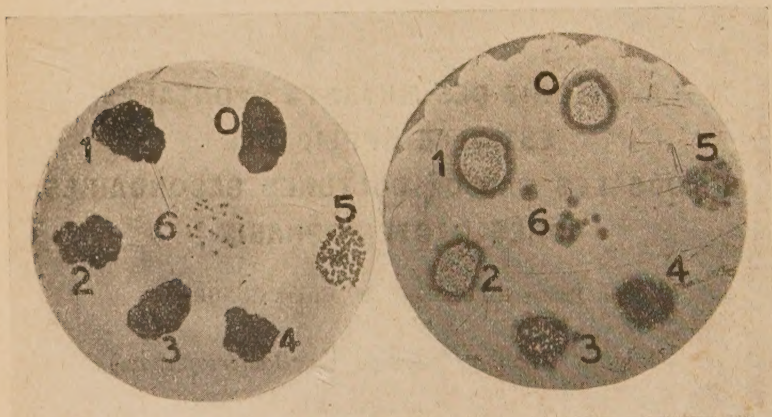


FIG. 1.

FIG. 2.

FIG. 1. — Titrage d'un bactériophage ne donnant pas de cultures secondaires. Bactériophage staphylococcique Twort sur staphylocoque blanc Twort. En 0, une goutte de bactériophage pur. En 1, 2, 3, 4, 5 et 6, une goutte des dilutions de 10^{-1} à 10^{-6} . La lyse est totale, sans trace de culture secondaire, de 0 à 4. En 5, plages confluentes. En 6, plages séparées.

FIG. 2. — Titrage d'un bactériophage donnant une culture secondaire. Bactériophage staphylococcique N sur staphylocoque blanc Twort. Mêmes indications que pour la figure 1. En 0, et 1, la lyse totale est presque entièrement remplacée par une abondante culture secondaire. Noter la marge dénudée et le liseré demi lysé qui entourent le disque de culture secondaire. En 2, la culture secondaire est moins abondante. En 3, elle est très clairsemée. En 4, elle est à peu près inexistante. En 5, les plages confluentes n'en présentent pas, ni en 6 les plages séparées.

l'action de divers agents physiques, comme les radiations, ou chimiques, notamment les antibiotiques.

Ces dernières années, les travaux de Demerec et Fano, 1945, basés sur l'analyse statistique des mutants résistants à divers bactériophages actifs sur une souche d'*Escherichia coli*, ont

apporté des arguments d'une valeur incontestable en faveur de cette thèse.

Si la conception des mutants résistants offre une explication satisfaisante à de nombreuses questions restées jusqu'alors un peu mystérieuses, elle ne paraît pas pouvoir, au premier abord, être appliquée à certains cas particuliers.

DISPARITION DES CULTURES SECONDAIRES LORSQUE LE BACTÉRIOPHAGE EST DILUÉ.

Confrontons, par exemple, la théorie avec les faits observés dans le cas du bactériophage staphylococcique « N ». Nous désignons ainsi un bactériophage isolé à partir d'un staphylocoque lysogène, et qui est actif sur le staphylocoque blanc Twort. C'est un bactériophage de lignée pure, isolé à partir d'une plage séparée. La souche sensible a été également purifiée par repiquage à partir d'une colonie.

Pratiquons un titrage de ce bactériophage par la méthode dite « à la goutte ». C'est une méthode rapide, économique et d'une précision suffisante pour la plupart des cas : on ensemence une boîte de gélose peptonée (1) avec IV gouttes d'une suspension, contenant environ 1 à 2 milliards de germes par centimètre cube, d'une culture de dix-huit heures du staphylocoque Twort sur gélose inclinée. Au moyen de pipettes calibrées donnant 1/40 de centimètre cube par goutte, on dépose sur la gélose des gouttes du bactériophage « N » et d'une série de ses dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-6} . Après incubation de dix-huit heures à 37° C, on constate que le bactériophage pur a donné, sur l'emplacement de la goutte correspondante, une lyse presque entièrement comblée par une culture secondaire (fig. 2, place 0). Les deux premières dilutions (10^{-1} et 10^{-2}) donnent également des cultures secondaires, mais leur abondance va sensiblement en diminuant (fig. 2, places 1 et 2). La dilution à 10^{-3} n'a fourni qu'un nombre limité de colonies (fig. 2, place 3). Enfin, les dilutions à 10^{-4} et 10^{-5} — cette dernière provoquant la formation de plages confluentes — n'ont permis aucun développement de colonies (fig. 2, places 4 et 5). La dilution à 10^{-6} donne quelques plages isolées qui ne présentent pas de cultures secondaires (place 6).

LE PHÉNOMÈNE DE LA « MARGE » DÉNUDÉE.

A côté de la disparition des cultures secondaires sous l'influence des dilutions les plus étendues, nous remarquons un phénomène

(1) Gélose : 1,5 g. ; peptone UCLAF : 3 g. ; NaCl : 0,6 g. p. 100 d'eau bidistillée ; pH ajusté à 7,5.

non moins curieux : autour des disques formés par les cultures secondaires, pour les emplacements correspondant aux gouttes du bactériophage pur et de ses premières dilutions (10^{-1} , 10^{-2}), il s'est formé, entre ces disques et la couche bactérienne continue, une marge dénudée (fig. 3, places 0, 1 et 2) qui a environ 1 à 2 mm. de largeur. Elle est elle-même limitée vers l'extérieur par un cercle un peu plus étroit (1 mm.) au niveau duquel la culture présente un aspect demi lysé.

La formation de cette marge dénudée nous paraît avoir une importance capitale dans le problème qui nous occupe.

Comment peut-on expliquer, en admettant la théorie des mutants spontanés, la présence d'abondantes cultures secondaires lorsque le bactériophage est concentré, et leur disparition lorsqu'il est dilué ? La proportion de mutants résistants demeurant constante dans la culture, au lieu de devenir plus rares et de disparaître pour les dilutions les plus grandes de bactériophage, les cultures secondaires ne devraient subir aucune variation. Leur abondance devrait être absolument indépendante de la concentration ou de la dilution du bactériophage.

Il semble qu'il y ait là un fait difficilement conciliable avec la théorie des mutants spontanés.

1° INFLUENCE DE LA RICHESSE DE L'ENSEMENCEMENT SUR L'ABONDANCE DES CULTURES SECONDAIRES. — *a)* Que se passe-t-il maintenant si l'on soumet à l'action du bactériophage et de ses dilutions des boîtesensemencées avec diverses concentrations de germes ? Dans l'hypothèse envisagée, plus l'ensemencement est riche — et plus, par conséquent, le nombre des mutants spontanés doit être élevé — plus les cultures secondaires devraient être abondantes. Les résultats ont été à l'opposé de ce que l'on pouvait attendre : des boîtes de gélose sontensemencées avec des quantités de germes allant de 4 à 0,4 milliards. On pratique, sur ces boîtes ainsi préparées, des titrages « à la goutte » du bactériophage N (tableau I). L'ensemencement le plus massif (4 milliards), au lieu de fournir la culture secondaire la plus abondante, est de beaucoup celui qui donne la plus maigre (fig. 3). Comme dans le cas précédent, l'abondance de la culture secondaire va en diminuant du Bactériophage pur aux dilutions les plus étendues. Pour les autresensemencements, de 2 à 0,04 milliards (fig. 4), on ne constate que des différences minimales, d'une boîte à l'autre, dans l'importance des cultures secondaires. Cependant, on notera un curieux déplacement du maximum d'intensité de ces cultures. Ce maximum, qui pour les premières boîtes correspond au Bactériophage pur, s'observe à la dilution de 10^{-3} , pour les boîtesensemencées avec 0,08 et 0,04 milliards (fig. 5). Après quoi, l'importance des cultures secondaires va de nouveau en diminuant de la dilution à 10^{-4} à

TABLEAU I. — Influence de la richesse de l'ensemencement sur l'abondance de la culture secondaire (Staphylocoque blanc Twort, Bactériophage staphylococcique N).

NUMÉRO des boîtes	NOMBRE de germes étalés sur la boîte en milliards	BACTÉRIOPHAGE STAPHYLOCOCCIQUE N (titrages « à la goutte »)						
		pur	10 - 1	10 - 2	10 - 3	10 - 4	10 - 5	10 - 6
1	4	Lyse ++	Lyse +	Lyse 15	Lyse 12	Lyse 4	Lyse 2	Pl. c. 0
2	2	Marge +++++	Marge +++++	Marge 70	Marge 77	Lyse 7	Lyse 2	Pl. c. 0
3	0,8	Marge +++++	Marge +++++	Marge +++++	Marge +++	Lyse 18	Lyse 2	Pl. c. 0
4	0,4	Marge +++++	Marge +++++	Marge +++++	Marge +++	Lyse +	Lyse 5	Pl. c. 0
5	0,2	Marge, anneau ++	Marge +++++	Marge +++++	Marge +++++	Lyse ++	Lyse 3	Pl. c. 0
6	0,08	Lyse, anneau ++	Marge +++	Marge ++++	Marge +++++	Marge +++	Lyse 14	Lyse 0
7	0,04	Lyse, anneau 77	Marge ++	Marge +++	Marge +++++	Marge +++	Lyse 21	Lyse 0

Les + indiquent les colonies trop nombreuses pour être comptées; +, 100 colonies environ; ++, colonies nombreuses, mais relativement espacées; +++, colonies nombreuses, plus rapprochées; +++++, colonies très nombreuses; ++++++, colonies presque confluentes; +++++++, culture continue. Les chiffres indiquent le nombre des colonies lorsque celles-ci sont numérables. Pl. c., plages confluentes.

la dilution à 10^{-6} (fig. 5 et 6). Ici encore, on voit se former, dans tous les cas où la culture secondaire est suffisamment abondante, une marge dénudée entre le disque central et la couche bactérienne continue.

b) Dans une autre série d'expériences ayant le même objet, nous avons fait varier, non pas la richesse de l'ensemencement, mais le délai entre l'ensemencement et le dépôt du bactériophage et de ses dilutions. Les boîtes séjournaient à l'étuve à 37° pendant des temps variant d'une à huit heures. Dans ces conditions, le nombre de germes présents sur la gélose allait en augmentant. Plus le délai était long — plus par conséquent la culture était abondante et plus elle était censée contenir de mutants résistants — plus rares étaient les cultures secondaires. A partir de quatre heures d'étuve, il ne s'en forme pratiquement plus.

c) Enfin, lorsque l'ensemencement est très faible, on constate l'apparition d'un nouveau phénomène : ainsi sur une boîte ensemencée avec 0,01 milliard de germes, la goutte de bactériophage pur donne une lyse totale au centre, une marge dénudée à la péri-

phérie et, à la limite de ces deux zones, un anneau de colonies plus ou moins continu (fig. 5, place 0).

2° ACTION D'UN BACTÉRIOPHAGE STAPHYLOCOCCIQUE, NE DONNANT PAS HABITUELLEMENT DE CULTURES SECONDAIRES, SUR LE MÉLANGE ARTIFICIEL DE LA SOUCHE SENSIBLE ET D'UNE SOUCHE RÉFRACTAIRE. — Les expériences précédentes, entreprises dans le but de concilier la théorie des mutants spontanés avec les faits, n'ayant abouti qu'à accentuer la divergence, nous avons tenté d'aborder le problème par un autre côté.

Le staphylocoque Twort dont nous nous sommes servi jusqu'à

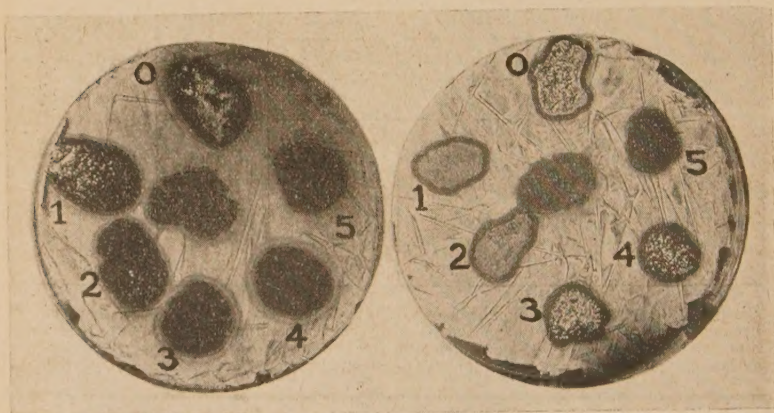


FIG. 3.

FIG. 4.

FIG. 3. — Bactériophage staphylococcique N sur staphylocoque Twort. Ensemencement de la gélose avec 4 milliards de germes. Mêmes indications que pour la figure 1. Les cultures secondaires sont dans l'ensemble très peu abondantes. Elles se raréfient très vite à mesure que la phage est plus diluée. Le maximum d'abondance s'observe avec le phage pur (en 0).

FIG. 4. — L'ensemencement est fait ici avec dix fois moins de germes. Les cultures secondaires sont partout plus abondantes que dans le cas de la figure 3. Le maximum d'abondance s'est déplacé du phage pur au phage dilué à 10^{-1} .

présent peut être considéré, par rapport au bactériophage N, comme constitué par un mélange, en proportions très inégales, de bactéries sensibles et de bactéries résistantes. Que se passerait-il si l'on soumettait à l'action d'un bactériophage donnant une lyse complète avec le staphylocoque Twort un mélange artificiellement réalisé de ce même staphylocoque sensible et d'un staphylocoque réfractaire ?

Pour de telles expériences, nous avons choisi le bactériophage

Twort qui, nous l'avons vu, donne, avec le staphylocoque Twort, une lyse non suivie de cultures secondaires (fig. 1).

Plusieurs cas sont à considérer :

a) Le germe réfractaire est un staphylocoque doré. Après avoir vérifié sa résistance absolue au bactériophage Twort, non seulement sur gélose, mais aussi en milieu liquide, nous avons utilisé le staphylocoque doré NB Boulgakov. Des résultats identiques

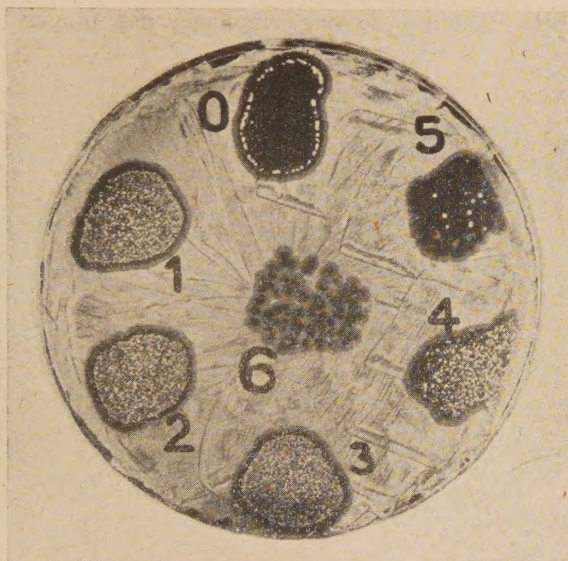


FIG. 5. — Bactériophage staphylococcique N sur staphylocoque Twort. Ensemencement avec 0,01 milliard de germes. Cultures secondaires abondantes. Maximum d'abondance avec le phage dilué à 10^{-3} . Avec le phage pur, raréfaction très importante des cultures secondaires. Formation d'un anneau de colonies, immédiatement en dedans de la marge lysée.

ont été obtenus avec les staphylocoques dorés Cheftaine, S3K, et d'autres.

Plusieurs boîtes de gélose sont ensemencées avec une même suspension (IV gouttes) d'une culture de dix-huit heures du staphylocoque blanc Twort, contenant environ 1 à 2 milliards de germes par centimètre cube, additionnée de suspensions, de richesse décroissante, d'une culture de dix-huit heures du staphylocoque doré NB Boulgakov. On effectue alors un titrage « à la goutte » du bactériophage Twort sur chaque boîte. En même temps, on pratique des ensemencements de boîtes témoins avec les diverses suspensions du staphylocoque doré seul. Quelle que soit

l'abondance de la culture du staphylocoque doré, les résultats sont les mêmes : la couche continue du staphylocoque blanc a disparu entièrement sous l'influence du bactériophage pur et de ses dilutions jusqu'à 10^{-4} . Mais dans les espaces dénudés, la culture du staphylocoque doré apparaît avec exactement la même intensité qu'elle montre sur les boîtes témoins correspondantes, c'est-à-dire en couche continue pour les suspensions les plus riches, et en colonies de plus en plus espacées pour les suspensions de richesse décroissante (fig. 6 et 7, tableau II). Pour les dilutions plus étendues de bactériophage, des plages apparaissent

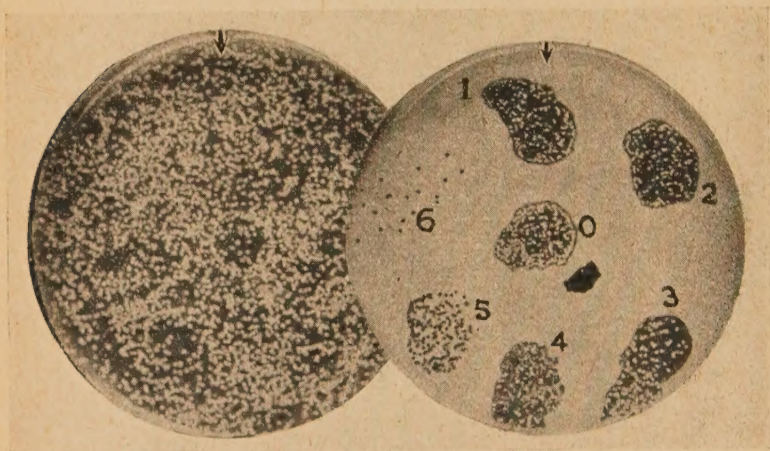


FIG. 6.

FIG. 7.

FIG. 6. — Bactériophage staphylococcique Twort sur le staphylocoque N. B. Boulgakov (St. doré, réfractaire au bactériophage Twort). L'ensemencement est fait avec une suspension très diluée de manière à obtenir, non une couche bactérienne continue, mais des colonies séparées. Le bactériophage Twort aussi bien pur que dilué se montre sans action sur la culture.

FIG. 7. — Le bactériophage Twort a été déposé, pur et dilué, sur la gélose ensemencée avec un mélange, en proportions inégales, de germes sensibles (staphylocoque Twort, nombreux) et de germes réfractaires (St. doré N. B. Boulgakov, peu abondants). La suspension de ce dernier germe est la même que celle qui a servi à ensemencer la boîte de la figure 6. On voit que le bactériophage pur (0) et ses dilutions à 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} ont lysé la culture sensible et ont laissé le germe réfractaire former des colonies aussi abondantes que sur la boîte de la figure 6. Pas de marge lysée, ni de raréfaction des colonies résistantes avec les dernières dilutions du bactériophage.

sont qui sont, soit comblées entièrement par la culture du staphylocoque doré, soit parsemées de colonies de ce germe. On n'observe pas la formation d'une marge dénudée entre le disque

TABLEAU II. — Action du bactériophage staphylococcique Twort sur un mélange de staphylocoque sensible (St. Twort) et d'un staphylocoque réfractaire (St. NB Boulgakov). Le germe sensible est ensemencé abondamment. Le germe résistant est dilué de telle façon que les boîtes témoins présentent des colonies suffisamment séparées pour être numérables.]

NUMÉRO des boîtes	ENSEMENCEMENT	BACTÉRIOPHAGE TWORT (titrages à la « goutte »)						
		pur	10 - 1	10 - 2	10 - 3	10 - 4	10 - 5	10 - 6
1 Témoin.	St. Boulgakov seul.	Pas de lyse 156	Pas de lyse 64	Pas de lyse 64	Pas de lyse 119	Pas de lyse 43	Pas de lyse 91	Pas de lyse 65
2	Mélange St. Twort + St. Boulgakov.	Lyse 170	Lyse 180	Lyse 56	Lyse 104	Lyse 62	Pl. c.	19 Pl.

Les chiffres indiquent le nombre des colonies. Pl. c., plages confluentes; pl., plages isolées.

de culture du germe réfractaire et la couche continue du germe sensible. Le résultat ici est bien conforme à celui qu'on pouvait attendre : dans le mélange d'un germe sensible et d'un germe réfractaire, l'abondance de la culture résistante est absolument indépendante de la concentration du phage. Elle ne dépend que de la richesse du mélange d'ensemencement en germe réfractaire. C'est un tel résultat qu'on aurait dû obtenir, d'après la théorie des mutants spontanés, avec le staphylocoque Twort et le bactériophage N.

b) Le germe réfractaire est un staphylocoque blanc. On peut faire à l'expérience précédente une objection sérieuse : le germe réfractaire appartient à une espèce différente de celle du germe sensible. Prenons alors un staphylocoque blanc, le staphylocoque « mal perforant » de la collection de M. Legroux. Ce staphylocoque est, lui aussi, absolument réfractaire au bactériophage Twort. Les résultats sont exactement les mêmes que pour le staphylocoque doré : pas de variations dans l'importance des cultures ni dans le nombre des colonies réfractaires, pas de marge lysée, pas de disparition de la culture aux dilutions de bactériophage précédant la formation de plages.

c) Le germe réfractaire provient d'une culture secondaire du staphylocoque sensible. Si les résultats des dernières expériences sont si différents de ceux qui ont été décrits à la suite de l'action du bactériophage N sur le staphylocoque Twort, cela provient peut-être de ce que le staphylocoque « mal perforant » est, quoique blanc, encore trop éloigné du staphylocoque sensible.

Il faudrait pouvoir expérimenter avec une souche de ce dernier, isolée d'une culture secondaire à l'action du bactériophage Twort. Nous avons vu plus haut que celui-ci ne donnait habituellement pas de cultures secondaires. Cependant, en opérant dans des conditions particulières (lyse en milieux liquides pauvres, P. Nicolle et P. Ducrest, 1947), on observe parfois l'apparition de cultures secondaires. C'est ainsi que nous avons pu obtenir un staphylocoque Twort R, qui est doué d'un certain degré de résistance vis-à-vis du bactériophage Twort. Cette résistance n'est toutefois pas absolue : si l'on dépose quelques gouttes du bacté-

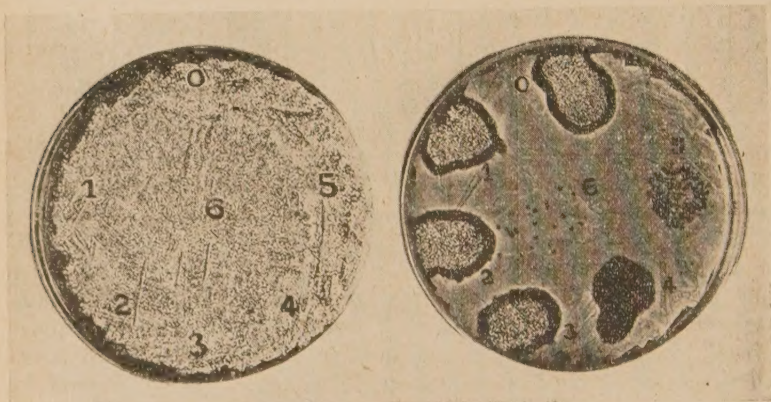


FIG. 8.

FIG. 9.

FIG. 8. — Boîte de gélose ensemencée avec une suspension relativement pauvre de staphylocoque Twort R (issu d'une culture secondaire apparue dans une culture de staphylocoque Twort lysée par le bactériophage Twort en milieu liquide pauvre). Le bactériophage Twort se montre inactif sur la culture. (En réalité, il n'est pas complètement inactif, car, sur une culture en nappe continue, une goutte de ce bactériophage donne parfois une plage ou deux.)

FIG. 9. — La boîte a été ensemencée avec un mélange de staphylocoque Twort (sensible) et de staphylocoque Twort R, résistant. Le staphylocoque Twort était abondant et a fourni une culture en couche continue. Le staphylocoque Twort R était assez peu abondant. Il a donné des colonies confluentes comme on peut le constater sur la boîte témoin de la figure 8. On retrouve ici, sous l'effet du bactériophage Twort pur et de ses dilutions, l'aspect qui a été décrit à l'occasion de la figure 2 : raréfaction progressive de la culture résistante à mesure que l'on passe du bactériophage pur à ses dilutions, formation d'une marge lysée entre la couche continue et le disque de culture résistante, disparition complète de la culture résistante avec le phage dilué à 10^{-4} .

riophage pur sur une boîte ensemencée avec le staphylocoque Twort, on voit se former, parfois, une plage ou deux à l'endroit où une des gouttes a été déposée. Le nombre des éléments actifs

TABLEAU III. — Action du bactériophage staphylococcique Twort sur un mélange de staphylocoque sensible (Twort) en quantité massive et d'un staphylocoque résistant (Twort R) en quantité moindre. Le staphylocoque Twort R provient d'une culture secondaire à l'action du bactériophage Twort sur le staphylocoque Twort.

	ENSEMENCEMENT		BACTÉRIOPHAGE TWORT (titrages « à la goutte »)						
	St. Twort (sensible)	St. Twort R (résistant)	pur	10 - 1	10 - 2	10 - 3	10 - 4	10 - 5	10 - 6
1	0	10 - 3	Nombreuses colonies presque confluentes des gouttes du bactériophage et de ses dilutions.						
2	+	10 - 3	Marge	Marge	Marge	Marge	Pl. cl.	130 pl.	24 pl.
3	0	10 - 4	++++	++++	++++	+++	0	0	0
4	+	10 - 4	Colonies nombreuses, mais distinctes. Aucune action des gouttes du bactériophage et de ses dilutions.						
			Marge	Marge	Marge				
			lyse	lyse	lyse	lyse	lyse	130 pl.	25 pl.
			217	180	132	93	0	0	0
5	0	10 - 3	Colonies isolées. Aucune action du bactériophage pur ou dilué.						
6	+	10 - 5	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Pl. c.	23 pl.
			19	15	11	5	0	0	0

On prépare des suspensions de St. Twort et du St. Twort R, sensiblement équivalentes (environ 2 milliards de germes par cm³). La suspension du St. Twort est utilisée sans dilution. La suspension du St. Twort R est diluée à 10 - 3, 10 - 4, 10 - 5, et ces trois dilutions sont utilisées successivement (Boîtes 1, 3, 5) seules ou en mélange avec le St. Twort (boîtes 2, 4 et 6).

de ce bactériophage sur la souche résistante est donc inférieur à 40 corpuscules par centimètre cube, alors que, vis-à-vis de la souche Twort, il est de plusieurs milliards de corpuscules actifs par centimètre cube. Malgré sa très faible sensibilité, la souche Twort R va se comporter très différemment des souches réfractaires étudiées jusq'ici.

Ajoutons que la souche Twort R n'est pas lysogène, c'est-à-dire qu'elle ne véhicule pas un bactériophage actif sur la souche Twort.

Une série de boîtes de gélose est ensemencée avec des suspensions de densité décroissante du staphylocoque Twort R (boîtes témoins). Une autre série reçoit les mêmes suspensions additionnées d'une quantité constante du staphylocoque sensible (environ 1 à 2 milliards de germes par centimètre cube). Toutes ces boîtes sont soumises à des titrages « à la goutte » du bactériophage Twort.

On constate (tableau III, fig. 8 et 9) que : 1° sur les boîtes témoins le nombre des colonies du staphylocoque Twort R, ou l'importance de ses cultures, ne sont pas affectés par le bacté-

riophage même pur, ce qui confirme le degré élevé de résistance de cette souche.

2° Pour les boîtes ensemencées avec le mélange des deux souches, le bactériophage pur n'a pas diminué sensiblement l'abondance de la culture du germe résistant. Mais, fait très intéressant, et qui apporte enfin la clarté sur la question, l'intensité de la culture ou le nombre des colonies ne cessent de diminuer, à mesure que le bactériophage est plus dilué.

3° Pour la dilution à 10^{-4} du bactériophage, toute culture du germe résistant a disparu.

4° Les plages confluentes, les plages isolées, aussi nombreuses que sur le staphylocoque Twort seul, ne présentent sur leur surface aucune culture du staphylocoque résistant.

5° A la périphérie du disque des colonies résistantes, pour le bactériophage pur et ses premières dilutions, il s'est formé une marge dénudée exactement semblable à celle qui a été décrite plus haut pour le bactériophage N agissant sur la souche Twort.

En utilisant comme germe résistant le staphylocoque Twort R provenant de l'action du bactériophage Twort sur la souche Twort, le phénomène décrit au début de ce travail peut donc être reproduit. Ainsi se trouve écartée une objection gênante contre la théorie des mutants spontanés.

DISCUSSION.

Les expériences faites avec des germes résistants provenant de cultures secondaires ont permis de lever l'objection qui avait été faite au début de ce travail à l'encontre de la théorie des mutants résistants. La disparition des cultures secondaires avec le bactériophage N dilué est due à des phénomènes surajoutés qui donnent aux faits une apparence contradictoire avec la théorie.

Il reste à expliquer pour quelle raison les cultures secondaires se raréfient et même disparaissent avec les dilutions du bactériophage, pourquoi les plages en demeurent toujours exemptes et comment se forme, entre la culture secondaire et la couche bactérienne continue, cette marge dénudée si caractéristique.

A ces questions, nous ne pouvons, dans l'état actuel de nos recherches, répondre que par des hypothèses. Celle qui nous paraît la plus plausible est la suivante : la lyse bactériophagique est un phénomène complexe dans lequel entrent en action, non seulement le bactériophage lui-même, mais de nombreux autres facteurs, soit présents dans le lysat, soit formés à la faveur de la lyse. Ces facteurs peuvent être d'origine bactérienne ou d'origine phagique. Ce sont des lysines (Sertie), des substances bactériolytiques (T. F. Anderson), des substances bactériostatiques et même très probablement des substances antiphages, sans compter

d'autres facteurs tendant à stimuler la croissance des germes. Les effets de toutes ces substances s'ajoutent ou bien donnent lieu à des phénomènes d'interférence.

Au centre de l'emplacement où la goutte du bactériophage pur a été déposée, l'action du principe lytique est presque immédiate. La culture n'a pas le temps, pour ainsi dire, de se développer : elle subit une lyse rapide. L'effet du bactériophage se montre ici dans sa pureté à peu près complète ; les mutants résistants donneront un nombre de colonies sensiblement égal à leur propre nombre.

En bordure de la goutte, les choses prennent une autre allure : le bactériophage se trouve en contact avec une culture jusqu'alors non touchée par la bactériophagie, et qui s'est développée intensément. Il est amené, à cet endroit, à agir sur une culture très dense. La lyse massive des bactéries mettrait en liberté une quantité importante de « lysines » d'origine bactérienne. Ces lysines, un peu moins spécifiques que le bactériophage, lyseraient les cultures secondaires à proximité du lieu de leur formation, c'est-à-dire en bordure de la souche bactérienne continue et donneraient naissance à la marge dénudée. Leur spécificité, plus large que celle du bactériophage, leur permettrait de lyser aussi les cultures résistantes apparentées à la souche sensible, mais elles seraient dépourvues d'action sur les germes plus éloignés, comme les staphylocoques dorés ou le staphylocoque blanc « mal perforant ». Nos résultats rejoignent ici un travail de Sertic et Boulgakov, 1939, sur le « groupement des souches d'*Escherichia coli* à l'aide des lysines B sécrétées par les bactériophages » (avec cette différence, toutefois, que nous pensons plutôt, dans notre cas, à une origine bactérienne et non phagique des substances lytiques). Avec ces auteurs, il nous paraît logique d'utiliser l'action de ces substances pour l'évaluation du degré de parenté entre les différentes souches. Cette détermination serait très aisée par la recherche systématique du phénomène de la marge dénudée sur des mélanges de la souche sensible et d'une souche résistante. Il y aurait là une nouvelle technique à mettre au point, qui compléterait les méthodes habituelles de caractérisation des types bactériens par les bactériophages (typing).

Dans cette lyse à deux degrés (1^{er} degré : action du bactériophage ; 2^e degré : action des lysines), on ne peut manquer de reconnaître l'équivalent sur milieux solides, à notre connaissance non encore signalé, de la « lyse secondaire » en milieux liquides décrits en 1932 et 1933 par E. Wollman : lorsqu'on ajoute au mélange inerte d'un staphylocoque phagorésistant et d'un bactériophage, en bouillon, un staphylocoque sensible, la lyse bactériophagique de ce dernier provoque la libération d'autolysines moins spécifiques que le bactériophage. Ces autolysines —

Wollman dit : ces diastases — entraînent la lyse secondaire du germe résistant.

La lyse secondaire en milieux liquides est une « somme » des deux actions ; elle est, de ce fait, malaisée à étudier. La lyse à deux degrés sur milieux solides, du fait de sa séparation en zones distinctes, se prête certainement mieux à l'analyse.

RÉSUMÉ.

1° Le bactériophage staphylococcique N agissant sur le staphylocoque Twort, fournit des cultures secondaires plus abondantes lorsqu'il est déposé pur sur la gélose que lorsqu'il est dilué.

2° Suivant la théorie des mutants spontanés, l'intensité des cultures secondaires devrait être, au contraire, indépendante de la concentration du bactériophage.

3° Diverses expériences avec des mélanges du staphylocoque sensible et de staphylocoques résistants ont montré que l'apparente contradiction des faits et de la théorie était due à des phénomènes surajoutés.

4° La disparition des cultures secondaires pour le bactériophage dilué et la constitution d'une marge dénudée entre les cultures secondaires et le gazon bactérien pour le bactériophage pur s'expliqueraient si l'on admettait une lyse à deux degrés (1^{er} degré : action du bactériophage sur le germe sensible ; 2^e degré : action, sur le germe résistant), de substances bactériolytiques mises en liberté par la lyse bactériophagique du germe sensible. Cette lyse à deux degrés serait l'équivalent, sur milieux solides, de la lyse secondaire décrite par E. Wollman en milieux liquides.

5° La recherche de la marge dénudée est envisagée comme moyen pour déterminer les parentés entre diverses souches de staphylocoque.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON (T. F.). *J. Cell. comp. Physiol.*, 1945, **25**, 1.
 BORDET (J.). *Ces Annales*, 1925, **39**, 717.
 BURNET (F. M.). *J. Path. a. Bact.*, 1929, **32**, 15.
 DEMEREC (M.) et FANO (U.). *Genetics*, 1945, **30**, 119.
 GRATIA (A.). *J. exp. Med.*, 1921, **34**, 115.
 HÉRELLE (F. d'). *Le Bactériophage et son comportement*, Paris, 1926.
 LURIA (S.-E.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 577.
 NICOLLE (P.) et DUCREST (P.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 755.
 SERTIC (V.) et BOULGAKOV (N. A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 444.
 WOLLMAN (E.). *Ces Annales*, 1932, **49**, 41.
 WOLLMAN (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **112**, 164.

Mme J. Josse-Goichot : La communication de P. Nicolle et G. Conge

est très intéressante et il semble que les faits cités par eux ne soient pas des phénomènes isolés. Au cours d'expériences tout à fait différentes, nous sommes arrivée à des conclusions analogues. Nous étudions en effet les troubles dus aux bactériophages dans la fermentation lactique. Nous avons vu que, après le retard de la coagulation dû à la lyse des microbes sensibles par le phage, la coagulation par les microbes résistants se faisait, dans certains cas, beaucoup plus rapidement en présence de phage concentré. Ces faits furent confirmés par des expériences sur plaques de gélose où les colonies résistantes obtenues étaient d'autant plus nombreuses que l'étalement de la souche sensible était fait avec du phage plus concentré. Ces faits font partie d'un travail d'ensemble qui sera publié incessamment.

ANTIBIOTIQUES ET LYSÉ BACTÉRIOPHAGIQUE

I. — PROTECTION DES COLONIES DÉVELOPPÉES A LA PÉRIPHÉRIE DE LA ZONE D'ACTION DE LA STREPTOMYCINE CONTRE L'ACTION DU BACTÉRIOPHAGE (*STAPHYLOCOCCUS ALBUS* TWORT ET *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* S3K)

par EWALD EDLINGER (*).

(Institut Pasteur, Service du Bactériophage et C. N. R. S.)

Lorsqu'onensemence une boîte de gélose (1) en étalant une suspension d'une culture jeune du Staphylocoque blanc Twort sur gélose inclinée et qu'on dépose ensuite 1 goutte d'une solution de pénicilline (10 unités par centimètre cube) on obtient une zone d'inhibition affectant l'aspect d'un disque dénudé à bords nets (fig. 1). Si l'on opère dans les mêmes conditions avec la streptomycine (500 γ par centimètre cube), il se forme, à la limite extrême du champ d'action de la streptomycine, une couronne de colonies staphylococciques (fig. 2).

En ensemençant une boîte de gélose avec du Staphylocoque Twort, et ensuite en étalant sur la boîte le phage correspondant, on obtient, après séjour de dix-huit heures à l'étuve à 37° C, une lyse complète. Que se passe-t-il si l'on dépose sur une boîte de gélose, ensemencée avec le Staphylocoque Twort et son Bactériophage, 1 goutte de pénicilline (10 unités par centimètre cube) et, sur une autre boîte, 1 goutte de streptomycine (500 γ par centimètre cube) [Merck Calcium Chloride complex] ?

La pénicilline n'apporte aucun changement dans la lyse complète de la culture du Staphylocoque par le Bactériophage. Ce fait n'est pas étonnant, puisqu'il est démontré par plusieurs auteurs que cet antibiotique n'est doué d'aucun pouvoir inactivant vis-à-vis des Bactériophages (F. Himmelweit, 1945 [1] ; D. Jones, 1945 [2] ; P. Nicolle et M. Faguet, 1947 [3] ; W. F. Elford, 1948 [4] et que même, dans certaines conditions, la pénicilline et le Bactériophage exercent une action synergique (Himmelweit, Nicolle et Faguet, Elford).

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 février 1949.

(1) 1,5 g. de gélose et 3 g. de peptone UCLAF et 0,6 g. NaCl p. 100 g. d'eau du robinet ajusté à pH 7,8.

Dans le cas de la streptomycine, on observe, après vingt-quatre heures et, mieux encore, après quarante-huit heures, à l'endroit où la goutte a été déposée, un anneau de plusieurs rangs de petites colonies. Les rangs externes montrent parfois des colonies plus ou moins atteintes par la bactériophagie, tandis que les colonies des rangs médians, relativement grosses, et celles des rangs internes, devenant de plus en plus petites vers le centre, ne présentent aucune trace de lyse (fig. 3).

Cet anneau correspond-il à la couronne des colonies dont nous



FIG. 1.

avons signalé la formation sous l'action de la streptomycine seule ? Pour répondre à cette question, ensemençons toute la surface d'une boîte de gélose avec une suspension de Staphylocoque blanc Twort, puis étalons le Bactériophage Twort sur une moitié de la surface : après avoir attendu que la surface de la boîte soit à nouveau sèche, déposons au centre 1 goutte d'une solution de streptomycine (500 : par centimètre cube), de telle manière qu'une moitié de la goutte se trouve placée dans le secteur qui contient le germe seul et l'autre moitié dans le secteur qui a été ensemencé avec le germe et le phage. Après séjour à 37° C pendant vingt-quatre heures ou mieux quarante-huit heures, on

constate qu'une nappe continue de culture s'est développée sur une moitié de la boîte avec seulement, au milieu, un demi-disque dénudé correspondant à l'espace où la streptomycine a exercé son pouvoir antibiotique. A la limite du champ d'action de l'antibiotique se voit la demi-couronne de petites colonies dont nous avons signalé l'existence ci-dessus. Sur la moitié de la boîte qui a reçu

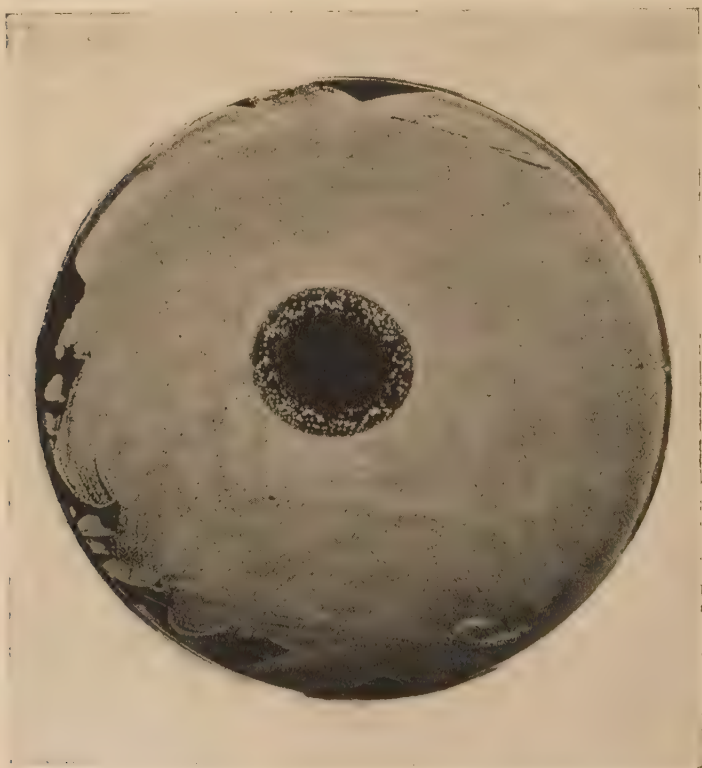


FIG. 2.

le Bactériophage la lyse est complète, à l'exception d'un demi-anneau de petites colonies qui complète la demi-couronne de l'autre moitié. Les deux demi-cercles présentent sensiblement le même rayon ; toutefois, en milieu bactériophagique, leur largeur est un peu plus étroite : une ou deux rangées de colonies manquent à la périphérie de l'anneau (fig. 4).

Ce fait ressemble beaucoup à un phénomène signalé par P. Nicolle en 1947 [5], puis étudié par P. Nicolle et M. Mimica, 1947 [6] et réalisé avec 1 goutte de formol ou d'un autre antiseptique dans les mêmes conditions.

Nous avons cherché à déterminer les conditions de la production de ce phénomène afin de l'expliquer.

1° INFLUENCE DES VARIATIONS DU NOMBRE DES GERMES A L'ENSEMENCEMENT. — Le nombre des germes n'a pas, entre des limites très larges, une importance bien grande, bien qu'une suspension dense soit plutôt favorable : pratiquement IV gouttes d'une sus-

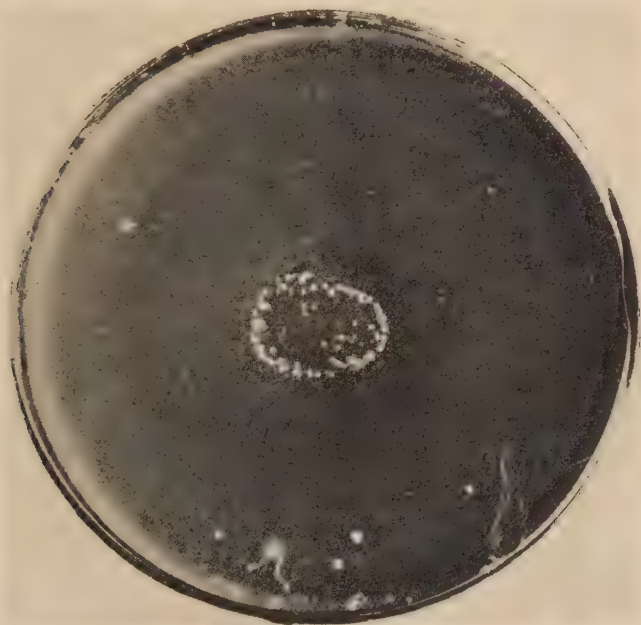


FIG. 3.

pension d'un ou deux milliards de germes par centimètre cube suffisent.

2° INFLUENCE DE LA RICHESSE EN PHAGES SUR LA FORMATION DE L'ANNEAU. — Une très forte concentration en phages réduit l'anneau à un seul rang de petites colonies transparentes plus ou moins espacées. L'anneau devient plus large à mesure qu'on utilise des dilutions plus grandes du filtrat phagique. Et même il se forme encore lorsque la lyse ne couvre pas complètement la surface de la couche bactérienne (plages confluentes).

3° INFLUENCE DE LA DILUTION DE STREPTOMYCINE SUR LA CONSTITUTION DE L'ANNEAU. — Nous avons déjà signalé plus haut que le

rayon de la couronne de colonies située à la limite du champ de l'action antibiotique d'une goutte de streptomycine et le rayon de l'anneau ont sensiblement la même longueur. Mais la longueur du rayon de l'anneau et celle de la couronne sont variables. Il faut ici remarquer qu'on n'utilise, dans ces expériences, qu'une goutte de la dilution de streptomycine et que la quantité de cet antibiotique employée réellement n'est que le quarantième du



FIG. 4.

titre de la dilution, puisque nous avons utilisé des pipettes Pasteur calibrées donnant XL gouttes par centimètre cube (tableau I).

Il y a donc une relation étroite entre le pouvoir antibiotique de la streptomycine et la formation de l'anneau. La limite de sensibilité du *Staphylocoque Twort* est, d'après les résultats de la méthode des cylindres, 1,25 γ de streptomycine. Or, c'est justement cette dose qui permet encore la formation de l'anneau.

TABLEAU I.

TITRE DES DILUTIONS de streptomycine en gamma/cm ³	QUANTITÉ de streptomycine dans une goutte 1/40 cm ³ en gamma	RAYON DE L'ANNEAU en millimètres
5.000	125	20
2 500	62,5	16
1,250	31,25	13
1.000	25	11
625	15,6	9
500	12,5	8
312	7,8	7,5
100	2,5	6
50	1,25	(plaque de colonies).
25	0,6	4
		Lyse totale.

4° ETUDE DES COLONIES DE L'ANNEAU. — Les colonies de la couronne qui limite le champ d'action de la streptomycine et celles de l'anneau formé en territoire bactériophagique ont été repiquées sur gélose inclinée. Le titrage du Bactériophage Twort sur une souche provenant de la couronne (TwC) et sur deux souches de colonies de l'anneau (TwA 1 et TwA 2) donne le même résultat que le titrage avec la souche Twort originelle ; ces souches n'ont donc pas acquis de phagorésistance.

La streptomycino-sensibilité a été recherchée par la méthode des cylindres sur plaques de gélose. Elle a donné les résultats suivants (tableau II).

TABLEAU II.

STREPTOMYCINE en gamma	ZONE D'INHIBITION SUR LES SOUCHES :			
	Tw	Twc	TwA 1	TwA 2
15	+	+	+	+
7,8	+	—	—	±
3,9	+	—	—	—
1,9	+	—	—	—
0,9	—	—	—	—

Les souches de la couronne et de l'anneau sont donc dix fois moins streptomycino-sensibles que le Staphylocoque Twort originel.

5° TENTATIVES POUR OBTENIR UN ANNEAU AVEC LA STREPTOMYCINE EN PRÉSENCE D'AUTRES GERMES. — Nous avons cherché si d'autres

germes et leurs Bactériophages ne donneraient pas naissance au phénomène obtenu avec le Staphylocoque blanc Twort et son Bactériophage en présence de la streptomycine.

Tandis qu'une goutte de solution de streptomycine (500 γ par centimètre cube) forme une zone d'inhibition nettement délimitée dans des cultures de deux souches d'*E. coli* (souche Coli 36 et souche Bordet) et d'une souche de *B. subtilis*, nous avons noté l'apparition de colonies streptomycino-résistantes à la périphérie de la zone d'action streptomycinique dans une culture du *Staph. doré* S3K et du *Staph. doré* N. Boulgakov. Ces colonies sont exactement comme les colonies du Staphylocoque blanc Twort protégées contre la lyse bactériophagique.

6° INFLUENCE DE LA STREPTOMYCINE SUR LE NOMBRE DES CORPUSCULES BACTÉRIOPHAGES. — Afin de chercher si la streptomycine laissée en contact prolongé avec le filtrat bactériophagique ne diminue pas le nombre des corpuscules et montre ainsi le pouvoir antiphagique décrit par D. Jones, nous avons entrepris des essais dans lesquels la streptomycine était laissée, à diverses concentrations (de 1 à 500 γ par centimètre cube), en contact avec le filtrat bactériophagique, soit à la température du laboratoire, soit à 37° C. Après des différents temps, un titrage du filtrat bactériophagique sur les bactéries correspondantes était effectué. Les résultats avec la dilution de 500 γ streptomycine par centimètre cube sont exposés dans le tableau III.

TABLEAU III.

BACTÉRIOPHAGES	TITRE BACTÉRIOPHAGIQUE				
	avant le contact	après 3 heures	après 24 heures	après 48 heures	après 72 heures
Staphylococcique Twort .	4×10^8	2×10^8	$1,6 \times 10^8$	1×10^8	1×10^8
Staphylococcique Twort + 500 γ S/cm ³		4×10^8	$1,2 \times 10^8$	2×10^8	$5,2 \times 10^8$
Staphylococcique S3K .	$6,4 \times 10^8$	6×10^8	$1,6 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$	
Staphylococcique S3K + 500 γ S/cm ³		2×10^8	$4,8 \times 10^8$	8×10^7	
Staphylococcique NB Boul- gakov	$5,2 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	8×10^8	$2,4 \times 10^8$	
Staphylococcique NB Boul- gakov + 500 γ S/cm ³ .		$5,2 \times 10^8$	8×10^8	4×10^7	

D'après ces résultats, il nous est impossible de conclure à une action antiphagique importante de la streptomycine, du moins dans les conditions de nos expériences. Les variations du titre entre le filtrat témoin et entre le filtrat avec la streptomycine ne dépassent pas les limites d'erreur de la méthode.

DISCUSSION.

Dans l'état actuel de nos recherches, il est impossible de donner une explication du mécanisme de formation de l'anneau, mais les faits acquis permettent quelques suggestions. Le Staph. Twort, le Staph. S3K et le Staph. Boulgakov donnent toujours quelques colonies streptomycino-résistantes à la périphérie de la zone streptomycinique et ces colonies sont protégées par l'antibiotique vis-à-vis de la lyse bactériophagique. Cependant, en dehors de leur streptomycino-résistance acquise, les colonies ne sont pas phago-résistantes.

Nous n'avons pas pu confirmer les conclusions de D. Jones [2] sur une action antiphagique de la streptomycine. Ceci nous conduit à penser que ce phénomène de la formation d'un anneau des colonies est différent du phénomène avec le formol décrit par P. Nicolle [5] parce que le formol est un puissant agent d'inactivation pour le phage. La première condition pour la formation de cet anneau est l'apparition en plein territoire streptomycinique, de colonies streptomycino-résistantes. Ces colonies, selon différents auteurs, M. Klein et D. J. Kimmelman (1946) [7], C. A. Chandler et E. B. Schönbach (1946) [8], H. E. Alexander et G. Leidy (1947) [9], et surtout par M. Demerec (1948) [10] et T. F. Paine et M. Finland (1948 [11] dériveraient de mutants spontanés, au développement desquels la disparition des germes sensibles laisserait le champ libre. Cette théorie de la sélection par mutation spontanée n'est pas admise par tous ; ainsi E. Seligman et M. Wassermann (1947) [12] supposent que la résistance à la streptomycine est provoquée par une réponse physiologique de la cellule bactérienne endommagée (théorie de la mutation induite). M. Demerec [10] et T. F. Paine [11] estiment que la mutation se produit suivant différents degrés dépendant de la dose de streptomycine employée. Les colonies faiblement streptomycino-résistantes sont les plus fréquentes. Ceci peut expliquer la formation du cercle, où la concentration de la streptomycine qui diffuse dans la gélose est la plus faible.

S. Berkman, R. J. Henry, R. D. Housewright et J. Henry (1948) [13] constatent une adsorption de la streptomycine à la surface des cellules bactériennes également par les souches sensibles et résistantes. Les mêmes auteurs supposent dans un autre mémoire, 1948 [14], comme T. F. Paine et Finland [11], que la streptomycine inhibe un enzyme, spécialement un enzyme du métabolisme des glucides et précisément aux concentrations bactériostatiques. Il se peut donc que la présence de la streptomycine n'entravant pas la croissance des souches résistantes, ou bien empêche la fixation du phage par une sorte de blocage des récepteurs bactériophagiques à la surface bactérienne, ou bien inhibe

un métabolisme indispensable à la multiplication du phage ou à la production de la lyse. Mais ce sont là seulement des hypothèses et nous espérons, dans les travaux qui sont en cours, parvenir à mieux comprendre le mécanisme du phénomène.

RÉSUMÉ.

La streptomycine, bien que dépourvue, d'après nos résultats, de pouvoir inactivant direct sur les phages staphylococciques étudiés, protège contre la lyse bactériophagique les colonies de Staphylocoques (*St. albus* Twort, *St. aureus* S3K et NB Bulgakov) qui se développent à la périphérie de sa zone d'action. Il en résulte la formation d'un anneau de colonies aux confins du territoire inhibé par la streptomycine et du territoire lysé par le Bactériophage.

Les colonies de cet anneau sont constituées par des germes relativement streptomycino-résistants, mais ayant gardé la lyso-sensibilité des souches originelles.

Le pouvoir protecteur de la streptomycine pourrait s'expliquer de diverses manières : l'adsorption de la streptomycine par la surface de la Bactérie, admise par certains, rendrait celle-ci impropre à la fixation des corpuscules bactériophagiques ; ou bien la streptomycine inhiberait un processus métabolique non essentiel à la multiplication bactérienne, mais indispensable soit à la prolifération du phage, soit au mécanisme de la lyse.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] HIMMELWEIT (F.). *Lancet*, 1945, **2**, 104.
- [2] JONES (D.). *J. Bact.*, 1945, **50**, 122 et 341.
- [3] NICOLLE (P.) et FAGUET (M.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 490.
- [4] ELFORD (W. F.). *J. gen. Microb.*, 1948, **2**, 205.
- [5] NICOLLE (P.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 705.
- [6] NICOLLE (P.) et MIMICA (M.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 1072.
- [7] KLEIN (M.) et KIMMELMANN. *J. Bact.*, 1946, **52**, 471.
- [8] CHANDLER (C. A.) et SCHOENBACH (E. B.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1946, **64**, 208.
- [9] ALEXANDER (H. E.) et LEIDY (G.). *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 329.
- [10] DEMEREC (M.). *J. Bact.*, 1948, **56**, 61.
- [11] PAINE (T. F.) et FINLAND. *J. Bact.*, 1948, **56**, 207.
- [12] SELIGMAN (E.) et WASSERMANN (M.). *J. Immunol.*, 1947, **57**, 351.
- [13] BERKMAN (S.), HENRY (R.-J.), HOUSEWRIGHT (R. D.) et HENRY (J.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1948, **68**, 65.
- [14] HENRY (J.), HENRY (R.-J.), HOUSEWRIGHT (R. D.) et BERKMAN (S.). *J. Bact.*, 1948, **56**, 527.

M. Rybak : Le phénomène décrit par M. Edlinger paraît s'expliquer

par les observations de S. S. Cohen (*). Cet auteur a en effet montré que la streptomycine formait des complexes insolubles avec le phage T_2F du colibacille, ainsi d'ailleurs qu'avec les acides désoxyribonucléique et ribonucléique.

M. Edlinger : S. S. Cohen (l. c.) a montré que le phage T_2F obtenu en milieu synthétique est précipité par la streptomycine, tandis que le phage T_2N , dérivant d'un même phage originel, mais régénéré en milieu non-synthétique, n'est précipité par la streptomycine qu'en présence de désoxyribonucléase. Il ne semble pas, par conséquent, que l'on puisse trouver dans cette précipitation l'explication du phénomène de l'anneau, d'autant plus que, dans les conditions de mes expériences, la streptomycine n'a pas montré la moindre action antiphage.

(*) S. S. COHEN, *J. biol. Chem.*, 1947, **168**, 511.

L'INFLUENCE DE LA RADIATION COSMIQUE SUR LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE

Par S. G. ONG.

*(Hochalpine Forschungsstation Jungfrauoch
et Physiologisch Laboratorium, Leiden.)*

1° Nous présentons dans ce mémoire les résultats de deux séries d'expériences. Dans la première série les souris ont reçu, à Leyde (niveau de la mer), une injection intraveineuse de 1 mg. de B. tuberculeux, souche bovine Vallée. Elles sont transportées quatre jours après à la Station scientifique du Jungfrauoch (3.457 m.), après avoir séjourné pendant une nuit à Interlaken (567 m.). La plupart des souris ont souffert du mal des montagnes pendant les trois premiers jours à Jungfrauoch. Ensuite elles ont été soumises aux traitements suivants : Un groupe fut exposé directement à la radiation cosmique, un deuxième groupe fut placé sous un écran de plomb de 2 cm. qui donne l'intensité maximum de gerbes. Un troisième groupe fut placé dans le rocher, à une profondeur où ne pénètre pas le rayonnement cosmique. Un quatrième groupe fut placé dans le laboratoire, à la lumière du jour comprenant le rayonnement visible et les rayons ultra-violets jusqu'à 3.300 \AA , à une distance de 1 mètre de la fenêtre. Ce groupe fut exposé seulement au composant pénétrant de la radiation cosmique. Enfin, un cinquième groupe fut placé dans le même laboratoire, dans l'obscurité complète ; nous y reviendrons plus loin. La température fut maintenue constante à environ 17°C .

On fait les déterminations suivantes : 1° courbe de poids ; 2° courbe de mortalité ; 3° survie moyenne et 4° données cliniques et pathologiques.

2° COURBE DE POIDS. — La courbe des souris placées à la lumière du jour a la même forme que celle des souris non exposées à la radiation cosmique. Les courbes des souris exposées directement à la radiation cosmique ou sous 2 cm. de plomb sont

plus courtes. Cependant le poids moyen des souris exposées à la radiation cosmique est plus élevé que celui des souris non exposées à cette radiation.

3° COURBE DE MORTALITÉ. — La figure 1 montre la courbe cumulative de mortalité. On constate que la courbe des souris non exposées à la radiation cosmique a la même forme que celle des souris exposées à la lumière du jour. La dernière courbe

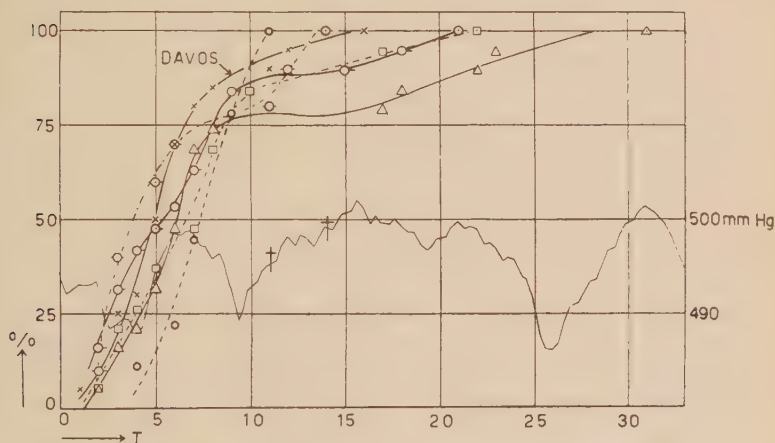


FIG. 1. — Courbe de mortalité. T, temps en jours après le traitement; Δ , souris exposées à la lumière du jour; \square , souris non exposées à la radiation cosmique; $-\circ-$, souris exposées directement à la radiation cosmique; \circ , souris exposées à la radiation cosmique sous 2 cm. de plomb; $\circ\cdot$, souris placées à l'obscurité complète.

montre cependant une diminution de mortalité au bout de neuf jours.

Si l'on compare ces deux courbes avec celles des souris exposées directement à la radiation cosmique ou sous un écran de 2 cm. de plomb, on constate l'effet favorable de la soustraction de la radiation cosmique et de l'exposition à la lumière du jour.

4° SURVIE MOYENNE. — La survie moyenne en jours des souris des différents groupes est représentée dans le tableau I. L'analyse de la variance (1) montre que les traitements considérés dans leur ensemble ne sont pas significatifs (1). Cependant, en examinant les variances au moyen du test de Bartlett, on constate

(1) Au sens où on emploie ce mot en statistique (Cf. *Les méthodes statistiques modernes*, Paris, Imprimerie Nationale, 1945).

TABLEAU I. — Temps de survie en jours après l'infection.

	SANS radiation cosmique	RADIATION cosmique directe	RADIATION cosmique sous 2 cm. de plomb	LUMIÈRE du jour
	9	10	9	9
	10	13	10	10
	10	14	10	10
	10	14	10	11
	11	15	11	12
	12	15	12	12
	12	16	13	13
	14	17	17	13
	14	17	18	13
	14		20	14
	14			14
	15			14
	15			14
	16			14
	16			23
	17			24
	23			28
	23			29
	28			37
Total . . .	283	131	130	344
Moyenne .	14,9	14,6	13,0	16,5

SOURCE DE VARIATION	SOMME des carrés	DEGRÉS de liberté	VARIANCE moyenne
<i>Analyse de la variance :</i>			
Traitements	86,1	3	28,7
Résiduelle	1.708,7	53	32,2
Total	1.794,8	56	

que la différence entre les variances de différents groupes est très significative (seuil de signification $P = 0,002$, tableau II).

En résumé, on constate que l'effet du traitement se révèle dans une variation significative de la variance et non de la survie moyenne. On peut en conclure que les différents groupes de souris ne proviennent pas d'une même population.

5° DONNÉES CLINIQUES ET PATHOLOGIQUES. — Il est important de remarquer que, parmi les souris exposées à la radiation cosmique sous 2 cm. de plomb, deux ont présenté une sévère hémorragie intestinale. Elles sont mortes quelques jours plus tard. Cette hémorragie est probablement en relation avec la variation de la

TABLEAU II. — Test d'homogénéité de Bartlett.

SOURCE de variation	SOMME des carrés	Degrés de liberté $k - 1$	$1/(k - 1)$	VARIANCE moyenne s^2	LOG s^2	$(k - 1) \text{ LOG } s^2$
Sans radiation cosmique	451,79	18	0,05556	25,0994	1,39966	25,1939
Radiation cosmique directe	38,22	8	0,12500	4,7775	0,67920	5,4336
Radiation cosmique sous 2 cm. de Pb.	138,00	9	0,11111	15,3333	1,18564	10,6708
Lumière du jour	1.086,74	18	0,05556	60,3744	1,78085	32,0553
Total	1 714,75	53	0,34723			73,3536
$\bar{s}^2 = 1714,75/53 = 32,3538 \quad 53 \times \log. \bar{s}^2 = 80,0263$ $\chi^2 = 2,3026 \times (80,0263 - 73,3536) = 15,36.$ Facteur de correction = 1,0407. χ^2 corrigé = $15,36/1,0407 = 14,76$ (1). Degré de liberté = 3.						
(1) Seuil de signification $P = 0,002$.						

pression barométrique. En effet, on constate dans la figure 1 que les deux souris sont mortes au cours d'une augmentation de la pression barométrique (déterminée au Jungfraujoch, Sphinx, 3.578 m. et réduite à 0° C). Les souris exposées directement à la radiation cosmique présentent des tremblements pendant les dernières semaines ; l'une d'elles est morte avec une ascite abdominale extrêmement importante. Ces symptômes n'ont jamais été observés parmi les autres groupes de souris, ni au Jungfraujoch, ni à Leyde, en utilisant la même souche de B. tuberculeux.

Il est intéressant de noter que parmi les souris placées sous 2 cm. de plomb, trois ont montré seulement quelques tubercules dans le poumon, tandis que les autres sont toutes mortes d'une tuberculose pulmonaire sévère.

6° DEUXIÈME SÉRIE. INFECTION AU JUNGFRAUJOCH (3.457 m.). — Dans cette série les souris sont infectées au Jungfraujoch par une injection intraveineuse de 0,7 mg. de b. tuberculeux, souche 1013. Les bacilles injectés sont donc directement en contact avec une pression diminuée d'oxygène dans le poumon qui est d'environ 60 mm. d'Hg au Jungfraujoch (3.457 m.). Or, Rich et Follis et indépendamment d'eux, Ong, den Dooren de Jong et Schornagel ont montré que les lésions histologiques et la quantité de b. tuberculeux sont diminuées et la survie moyenne prolongée quand les animaux tuberculeux sont placés à la pression atmosphérique

dans un air contenant moins de 10 volumes p. 100 d'oxygène. On peut donc supposer que cette expérience donnera un autre résultat que la précédente.

7° COURBE DE POIDS. — La figure 2 donne le poids moyen de quatre groupes de souris : a) souris placées à la lumière artificielle sans radiation cosmique ; b) souris placées sous 10 cm. de plomb et exposées à la radiation cosmique ; c) souris placées à la lumière artificielle et exposées directement à la radiation cosmique et d) souris placées à la lumière artificielle sous 2 cm. de plomb et exposées à la radiation cosmique. Comme dans la première série d'expériences on constate que le poids des souris

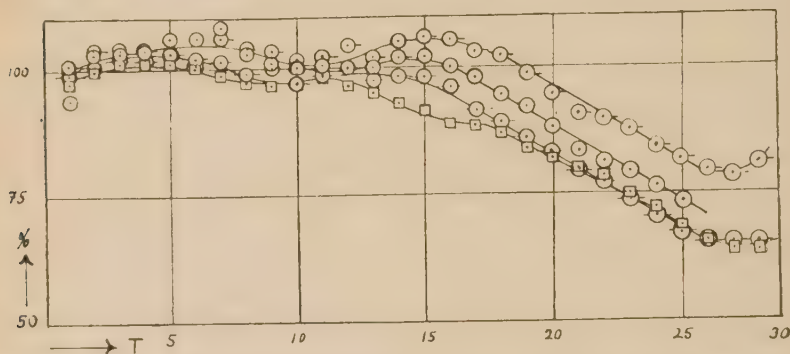


FIG. 2. — Courbe de poids. T, temps en jours après l'infection ; □, souris non exposées à la radiation cosmique ; ○, souris exposées directement à la radiation cosmique ; ○-, souris exposées à la radiation cosmique sous 2 cm. de plomb ; -○-, souris exposées à la radiation cosmique sous 10 cm. de plomb.

exposées à la radiation cosmique est plus élevé que celui des souris non exposées à la radiation cosmique.

Si l'on compare les courbes obtenues par les groupes b, c et d, on constate que le poids moyen des souris du groupe d est plus élevé que celui du groupe c et que ce dernier est plus élevé que celui du groupe b. Ce résultat montre que la composante douce et les gerbes de la radiation cosmique ont un effet retardateur sur la perte du poids au cours de la tuberculose.

8° COURBE DE MORTALITÉ. — Les courbes de mortalité des souris exposées directement à la radiation cosmique sous 2 cm. de plomb sont comparables à celles de la première expérience. La courbe de mortalité des souris placées sous 10 cm. de plomb a la même forme que celle des souris exposées directement à la radiation cosmique.

9° SURVIE MOYENNE. — L'expérience a été interrompue alors que deux souris de chacun des groupes suivants étaient encore

vivantes : 1° souris non exposées à la radiation cosmique ; 2° souris exposées sous 2 cm. de plomb et 3° souris exposées sous 10 cm. de plomb. L'analyse de la variance (tableau III), en ne comptant pas ces souris vivantes, montre que les traite-

TABLEAU III. — Temps de survie en jours après l'infection.

	SANS radiation cosmique	RADIATION cosmique directe	RADIATION cosmique sous 2 cm. de Pb.	RADIATION cosmique sous 10 cm. de Pb.
	7	4	6	10
	8	10	7	11
	9	16	12	13
	9	17	13	15
	14	18	20	17
	16	18	21	19
	18	19	23	20
	24	20	24	20
	25	22	25	23
	25	24	26	23
	26	25	26	25
	26	25	26	25
	(28)	25	27	25
	(28)	25	(28)	(28)
		25	(28)	(28)
Total . . .	263	293	312	302
Moyenne .	18,8	19,5	20,8	20,1

SOURCE DE VARIATION	SOMME des carrés	DEGRÉS de liberté	VARIANCE moyenne
<i>Analyse de la variance :</i>			
Traitements	17,4	3	5,8
Résiduelle.	2.255,4	48	53,0
Total	2.272,8	51	

(28), souris sacrifiée 28 jours après l'infection.

ments considérés dans leur ensemble ne sont pas significatifs. Le test d'homogénéité de Bartlett (tableau IV) montre également que la différence de variation parmi les groupes de souris n'est pas significative. Cependant un autre test d'homogénéité (Snedecor, *Statistical Methods*, 4^e édition, 1946, p. 211) montre une variation significative de mortalité parmi les groupes ayant reçu le même traitement. Le test montre également que la variation de survies moyennes n'est pas significative (tableau V).

TABLEAU IV. — Test d'homogénéité de Bartlett.

SOURCE DE VARIATION	SOMME des carrés	Degrés de liberté $k - 1$	VARIANCE moyenne s^2	LOG s^2
Sans radiation cosmique. .	764,9	12	63,74	1,80441
Radiation cosmique directe.	462,8	12	38,57	1,58625
Radiation cosmique sous 2 cm. de Pb.	684,8	12	57,07	1,75641
Radiation cosmique sous 10 cm. de Pb.	342,9	12	28,58	1,45606
Total			187,96	6,60313

$\bar{s}^2 = 187,96/4 = 46,99$ $\log \bar{s}^2 = 1,67201$ $4 \log \bar{s}^2 - \sum \log s^2 = 0,08491$
 $\chi^2 = 2,3026 \times (k - 1) \times 0,08491 = 2,35$. Degré de liberté = 3.
Facteur de correction = 1,007 χ^2 corrigé = $2,35/1,007 = 2,33$.

10° DONNÉES CLINIQUES ET PATHOLOGIQUES. — Il est important de remarquer que les souris mortes au début de l'expérience ne

TABLEAU V. — Test d'homogénéité.

SOURCE DE VARIATION	SOMME des survies en jours	SURVIE moyenne \bar{x}	$\chi^2 = \sum x^2 / \bar{x}$
Sans radiation cosmique.	235	18,4	42,26
Radiation cosmique directe.	243	18,7	24,75
Radiation cosmique sous 2 cm. de Pb.	256	19,7	34,76
Radiation cosmique sous 10 cm. de Pb.	246	18,9	18,44
Total	980		119,94 (1)

Degré de liberté = 48. $P < 0,001$.
Calcul des quatre traitements :
 $\sum x^2 = 226$ $\bar{x} = 980/4 = 245$ $\chi^2 = 226/245 = 0,92$. Degré de liberté = 3.

(1) Seuil de signification $P < 0,001$.

montrent que quelques tubercules dans le poumon. Par contre, on trouve des lésions tuberculeuses dans la rate, les reins et le foie. Les souris qui sont mortes ultérieurement montrent des lésions importantes de tuberculose dans le poumon. On a observé que si les lésions tuberculeuses dans le poumon sont importantes, les lésions dans les autres organes sont légères ou nulles et réciproquement.

On a observé, comme dans la première série, des hémorragies chez les souris exposées à la radiation cosmique : hémorragie des organes génitaux et de la bouche chez des souris placées sous 2 cm. de plomb, hémorragie intestinale chez des souris placées sous 10 cm. de plomb et hémorragies génitale et intestinale et rupture splénique chez des souris exposées directement à la radiation cosmique. Trois de ces souris sont mortes au cours d'une augmentation de pression barométrique et deux sont mortes au cours d'une diminution de pression barométrique.

11° DISCUSSION. — La première série d'expériences où les souris avaient été infectées *avant* transport au Jungfraujoch montre que la radiation cosmique a une influence nocive sur la tuberculose. De plus, contrairement à la notion généralement adoptée, la lumière du jour comprenant le rayonnement visible et les rayons ultra-violets jusqu'à 3.300 Å a une action favorable sur la tuberculose pulmonaire, à condition de ne pas être accompagnée par la composante douce et les gerbes de la radiation cosmique.

Dans la deuxième série d'expériences, où les souris sont infectées au Jungfraujoch (3.457 m.), la tuberculose évolue autrement. On a observé d'abord des lésions dans la rate, le rein et le foie et peu ou pas du tout dans le poumon, et ultérieurement les lésions dans le poumon sont importantes tandis qu'elles sont minimales dans les autres organes. Nous avons observé ce résultat également dans des expériences précédentes (*Proc. Ned. Akad. v. Wetensch.*, 1948, 51, 106).

On pourrait expliquer la faible atteinte des organes autres que le poumon par une anoxémie, de sorte que la quantité d'oxygène dans les tissus est insuffisante pour favoriser le b. tuberculeux. On sait que le b. tuberculeux est un aérobie strict.

Puisque les souris qui ne sont pas exposées à la radiation cosmique ne montrent pas d'hémorragie, on pourrait en conclure que les hémorragies observées sont dues à la radiation cosmique ou à une action simultanée de la radiation cosmique et de la pression barométrique.

En ce qui concerne le mécanisme d'action de la radiation cosmique, on pourrait supposer que l'action nocive est provoquée par une ionisation dans la cellule bactérienne ou dans le tissu. La composante dure est formée pour une grande partie par des particules peu ionisantes, tandis que la composante douce est fortement ionisante à la fin de sa trajectoire. L'intensité de la composante dure est peu affectée par l'épaisseur de la matière de l'ordre de 100 g. par centimètre carré, par contre, l'intensité de la composante fortement ionisante est considérablement influencée par l'épaisseur et la nature de la matière.

Je remercie sincèrement MM. D. Chalonge et F. Egger qui ont bien voulu prendre pour moi des spectres de transmission dans l'ultra-violet au Jungfraujoch. Je dois remercier également M. W. Mörkofer pour les déterminations de la pression barométrique au Jungfraujoch (Sphinx). J'ai bénéficié de l'aide technique de MM. U. Camerini, J. A. Gay, D. Ritson et M. A. Roberts dans les essais sur la radiation cosmique.

Ces recherches ont pu être effectuées grâce à une subvention de la Nederlandsche Organisatie voor zuiver Wetenschappelijk Onderzoek.

BIBLIOGRAPHIE

- RICH (A. R.) et FOLLIS (R. H. Jr). *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1942, **71**, 345.
ONG (S. G.), DEN DOOREN DE JONG (L. E.) et SCHORNAGEL (H. E.). *Koninkl. Ned. Akad. v. Wetensch.*, 1948, **51**, 106.

L'INFLUENCE DE LA HAUTE ALTITUDE SUR LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE

Par S. G. ONG.

*(Hochalpine Forschungsstation Jungfrauoch
et Physiologisch Laboratorium, Leiden.)*

1° On sait que le b. tuberculeux est un aérobie strict. C'est en utilisant cette propriété remarquable du b. tuberculeux que Rich et Follis, et indépendamment d'eux, Ong, den Dooren de Jong et Schornagel, ont essayé de traiter la tuberculose de l'animal par un séjour dans un air contenant une concentration abaissée d'oxygène. Pour obtenir un effet favorable, il est nécessaire que la concentration d'oxygène soit au-dessous de 10 volumes p. 100. Celle-ci correspond à une altitude de 6.000 m., tandis que les cliniciens ont signalé un effet favorable à une altitude plus faible (Davos, 1.560 m.).

C'est pour résoudre la contradiction de ces résultats du laboratoire et de la clinique que les expériences suivantes ont été exécutées.

Sept groupes de souris sont infectées à Leyde (niveau de la mer) par une injection intraveineuse de 1 mg. de b. tuberculeux, souche bovine Vallée. Un groupe (34 souris) reste à Leyde, un deuxième groupe est transporté à Davos (1.560 m.) et les autres groupes au Jungfrauoch (3.457 m.). Au Jungfrauoch, un groupe est placé dans le laboratoire à la lumière du jour comprenant le rayonnement visible et les rayons ultra-violetes jusqu'à 3.300 Å et à une distance de 1 m. de la fenêtre. Un autre groupe est placé dans le même laboratoire, à l'obscurité complète. Les trois autres groupes sont utilisés pour l'expérience avec la radiation cosmique dont le résultat est rapporté dans une communication précédente.

On a fait les déterminations suivantes : 1° courbe de mortalité ; 2° survie moyenne ; 3° courbe de poids et 4° données cliniques et pathologiques.

2° COURBE DE MORTALITÉ. — En comparant la courbe cumu-

lative de mortalité des souris placées à la lumière du jour au Jungfrauoch (3.457 m.) avec celle des souris placées à la lumière du jour à Davos (1.560 m.), on constate immédiatement l'effet favorable de la pression barométrique plus basse au Jungfrauoch (voir fig. 1 de la communication précédente). Dans tous les cas

TABLEAU I. — Temps de survie en jours après l'infection.

	JUNGFRAUOCH 3.457 m.				DAVOS 1.560 m.
	Obscurité	Lumière du jour	Sans radiation cosmique	Radiation cosmique	Lumière du jour
	9	9	9	9	8
	9	10	10	10	9
	9	10	10	10	9
	10	11	10	10	10
	10	12	11	10	10
	10	12	12	11	11
	11	13	12	12	12
	11	13	14	13	12
	12	13	14	13	12
	13	14	14	14	12
	14	14	14	14	13
	14	14	15	15	13
	14	14	15	15	13
	15	14	16	16	14
	15	23	16	17	14
	16	24	17	17	15
	21	28	23	17	18
	24	29	23	18	19
	27	37	28	20	23
Total. . .	263	314	283	261	247
Moyenne .	13,8	16,5	14,9	13,7	13,0

SOURCE de variation	SOMME des carrés	DEGRÉ de liberté	VARIANCE moyenne
<i>Analyse de la variance :</i>			
Traitements	142,1	4	35,5
Résiduelle.	2.446,7	90	57,2
Total.	2 588,8	94	

la courbe de mortalité des souris au Jungfrauoch est moins élevée que celle des souris à Davos.

L'effet favorable de la lumière du jour peut également être observé en comparant les courbes de mortalité des souris placées

à la lumière du jour et celle des souris placées à l'obscurité complète dans le même laboratoire.

3° SURVIE MOYENNE. — Le tableau I montre la survie moyenne en jours des différents groupes de souris. L'analyse de la variance montre que les traitements considérés dans leur ensemble ne sont pas significatifs. Cependant en comparant la survie moyenne des souris placées à la lumière du jour au Jungfrauoch avec celle des souris placées à la lumière du jour à Davos, on constate une différence apparemment significative (différence significative entre deux moyennes = 3,4 jours en admettant le seuil de probabilité $P = 0,05$). Mais en appliquant le test t on obtient $t = 1,77$; la table t montre pour $n = 38$ une probabilité $P = 0,09$ qui n'est pas significative. Le calcul montre qu'il faudrait utiliser au moins 25 souris par groupe pour que la différence devienne significative, toutes conditions égales.

Le test d'homogénéité de Bartlett (tableau II) montre que la différence entre les variances des différents groupes est fortement significative ($P = 0,003$). Ce résultat montre que les variances des différents groupes sont différentes et il suggère qu'il y aura probablement une différence significative entre les survies moyennes.

TABLEAU II. — Test d'homogénéité de Bartlett.

SOURCE DE VARIATION	SOMME des carrés Σx^2	DEGRÉ de liberté	VARIANCE moyenne s^2	LOG s^2
Jungfrauoch, obscurité . . .	468,5	18	26,03	1,41547
Jungfrauoch, lumière du jour.	1.086,7	18	60,37	1,78082
Jungfrauoch, sans radiation cosmique.	451,8	18	25,10	1,39967
Jungfrauoch, radiation cos- mique	187,7	18	10,43	1,01828
Davos, lumière du jour . . .	250,0	18	13,89	1,14270
Total			135,82	6,75694
$\bar{s}^2 = 135,82/5 = 27,16$ $\log \bar{s}^2 = 1,43393$ $5 \log \bar{s}^2 - \Sigma \log s^2 = 0,41271$ $\chi^2 = 2,3026 \times 18 \times 0,41271 = 17,11$. Degré de liberté = 4. Facteur de correction = 1,0222 χ^2 corrigé = $17,11/1,0222 = 16,73$ (1).				
(1) Seuil de signification $P = 0,001$.				

Malheureusement on n'a pas noté la survie moyenne des souris à Leyde (niveau de la mer), mais on sait qu'elles sont toutes mortes en moins de vingt-huit jours et que les premières souris ont succombé trois jours après l'infection.

4° COURBE DE POIDS. — Le poids moyen des souris placées à l'obscurité complète est moins élevé que celui des souris placées à la lumière du jour comprenant le rayonnement visible et les rayons ultra-violet jusqu'à 3.300 Å. On n'a pas déterminé le poids des souris restées à Davos et à Leyde.

5° DONNÉES CLINIQUES ET PATHOLOGIQUES. — Au point de vue macroscopique, on ne constate aucune différence entre les souris placées à Davos ou au Jungfraujoch. Toutes ont montré une tuberculose pulmonaire.

6° DISCUSSION. — L'effet favorable de la pression barométrique diminuée au Jungfraujoch (3.457 m.) sur la tuberculose expérimentale confirme le résultat favorable des sanatoria à Davos comparé avec celui des sanatoria au niveau de la mer.

La différence de résultat entre haute et moyenne altitude est probablement due à la pression barométrique moins élevée et à l'intensité plus forte du rayonnement ultra-violet dans la haute montagne.

Il est toutefois curieux qu'on ne puisse pas obtenir un résultat favorable au niveau de la mer en diminuant la concentration d'oxygène dans l'air (pression barométrique normale), de sorte qu'on obtienne la même tension alvéolaire d'oxygène dans le poumon que celle de Davos ou du Jungfraujoch.

Il sera intéressant de faire simultanément des expériences au niveau de la mer, une avec une pression barométrique diminuée (concentration normale d'oxygène, 21 p. 100) et une autre avec une pression barométrique normale (760 mm. Hg), mais en diminuant la concentration d'oxygène de sorte qu'on obtienne dans les deux cas une même tension alvéolaire d'oxygène.

Je remercie sincèrement les D^{rs} P.-C. Gugelot, P. Zuidema et G.-F. Locher qui ont bien voulu participer à l'expérience effectuée à Davos. Ces recherches ont pu être effectuées grâce à une subvention de la Nederlandsche Organisatie voor zuiver Wetenschappelijk Onderzoek.

BIBLIOGRAPHIE

- RICH (A. R.) et FOLLIS (R. H. Jr.). *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1942, **71**, 345.
 ONG (S. G.), DEN DOORLEN DE JONG (L. E.) et SCHORNAGEL (H. E.). *Koninkl. Ned. Akad. v. Wetensch.*, 1948, **51**, 106.

ACTION DE L'ACRIFLAVINE SUR LES LEVURES

II. — ÉTUDE GÉNÉTIQUE DU MUTANT « PETITE COLONIE »

par BORIS EPHRUSSI, HÉLÈNE HOTTINGUER et JEAN TAVLITZKI.

(Institut de Génétique du C.N.R.S.
et Institut de Biologie physico-chimique, Paris.)

Introduction.

Le présent travail a pour objet l'étude génétique des mutants de la levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiæ*) qui ont été décrits dans le mémoire précédent sous le nom de « petite colonie ». Reconnus d'abord par la taille limite réduite de leurs colonies, ces mutants se rencontrent fréquemment dans les populations normales de levures et y remplacent rapidement la forme normale si la culture est faite en présence d'acriflavine. Qu'il s'agisse de mutants spontanés ou « acriflavinés » (1), il s'agit de formes stables dont la constitution biochimique est nettement différente de celle de la forme normale, mais qu'au contraire aucun critère n'a permis jusqu'ici de différencier les uns des autres. Leur étude physiologique et biochimique détaillée sera relatée dans les mémoires III, IV et V de cette série. Pour la compréhension du présent travail il nous suffira de dire que ces mutants sont caractérisés par une déficience de leur système respiratoire, due à l'absence de la cytochrome-oxydase, et que ceci peut être mis en évidence soit par la détermination du quotient respiratoire (qui présente chez les mutants une valeur beaucoup plus élevée que chez la forme normale), soit par une réaction colorée de l'indophénoloxydase [réaction du « Nadi »] (2).

Méthode.

Dans les expériences dont nous exposerons ici les résultats, nous avons fait usage des croisements en masse de cellules

(1) Ce terme est utilisé ici afin de ne pas préjuger du mode d'origine de ces mutants qui sera discuté dans le mémoire VI de cette série.

(2) Nous tenons à remercier M^{me} S. Chevais, M^{lle} G. Perrodin et M. S. Y. Chen de l'aide qu'ils ont apportée dans l'exécution des expériences décrites dans ce travail, et M. L'Héritier des calculs inclus dans la Discussion.

haploïdes, selon la méthode de Lindegren et Lindegren (1943). On sait que cette méthode comporte le risque de diploïdisations dites « illégitimes », c'est-à-dire de formation d'asques à partir de cellules diploïdes résultant de la fusion de cellules haploïdes de la même souche. Nous avons cependant dû nous limiter à cette technique et renoncer à l'emploi de la méthode, à certains égards plus sûre, de Winge (croisement de paires de spores individuelles ; Winge, 1935, Winge et Laustsen, 1937), car nous n'avons jamais réussi à faire sporuler les « petites diploïdes » de la souche utilisée dans ce travail. Que cela ne soit pas un résultat fortuit paraît être confirmé par le fait qu'il nous a été également impossible de faire sporuler des souches diploïdes qui tirent leur origine de la fusion de deux « petites » haploïdes. Il semble donc bien que le mécanisme de la sporulation soit entravé chez les « petites » et ceci ne nous laisse pas de choix : seule la méthode des Lindegren est applicable à l'étude de notre problème. Nous l'avons employée sans hésitation du reste car, d'une part, aucune des souches que nous avons utilisées dans les croisements n'a jamais montré de tendance à la diploïdisation spontanée et parce que, d'autre part, nous ne nous sommes servis que de souches portant des « marqueurs » qui permettaient de contrôler l'origine « légitime » des asques étudiés (voir ci-dessous description des souches).

Il ressort de ce qui vient d'être dit que seul le croisement « *petite* » × « *grande* » a pu être étudié.

Matériel et techniques.

SOUCHES. — Toutes les souches utilisées dans ce travail ont pour origine la levure de boulangerie américaine « Yeast Foam » (*S. cerevisiae*) qui a été aimablement mise à notre disposition par le Professeur O. Winge de Copenhague. A partir de cette levure diploïde, plusieurs souches haploïdes ont été isolées, dont la souche 276/3 D (« *grande blanche* ») qui intervient dans nos croisements. Dans une autre souche haploïde de même origine, mais de « signe » opposé (276/3 B), un mutant rouge a été trouvé qui a donné naissance à la souche 276/3 Br (« *grande rouge* »), dont il sera également question ci-dessous. Enfin, à partir de la « *grande rouge* » 276/3 Br nous avons isolé de nombreux mutants « *petite colonie* », apparus soit spontanément, soit à la suite de traitements par l'acriflavine. Deux de ces mutants interviennent dans les croisements qui seront décrits : 1-sp, « *petite rouge* » spontanée, et 1-A, « *petite rouge* » acriflavinée. (Des réisolements par prélèvement de colonies de ces souches sur agar ont conduit à la constitution, pour chacune de celles-ci, de deux clones : 1-sp-1 et 1-sp-2 ; 1-A-1 et 1-A-2).

Les caractéristiques des souches énumérées, qui serviront de « marqueurs » dans les croisements, sont résumées ci-dessous :

SOUCHE	COULEUR DES COLONIES	SIGNE	FACULTÉS DE SYNTHÈSE	
			Adénine	Thiamine
276/3 D	Blanche.	+	+	+
276/3 Br.	Rouge.	—	—	—
1-sp.	Blanche.	—	—	—
1-A	"	—	—	—

On notera que la couleur des colonies des « petites rouges », qu'elles soient spontanées ou « acriflavinées », est blanche. La justification de leur nom réside dans le fait, dont la démonstration sera donnée dans la partie expérimentale, qu'elles portent le gène pour « rouge » qui ne se manifeste pas chez les « petites ».

Les symboles adoptés pour désigner les gènes dont dépendent les facultés de synthèse de l'adénine et de la thiamine sont, respectivement, *A* et *T* ; ceux de leurs allélomorphes récessifs, *a* et *t*. Disons dès maintenant que la production du pigment rouge et l'incapacité de synthétiser l'adénine sont deux manifestations du gène *a*. Dans les tableaux, le phénotype rouge sera indiqué par le symbole (R), et le phénotype mutant « petite colonie » par l'impression du génotype en caractères gras.

Nous n'avons énuméré ci-dessus que les souches parentales de nos croisements. Les lignées, isolées des générations hybrides successives, qui ont été choisies pour les « backcross », seront décrites au cours de la présentation des résultats.

Enfin, quelques mots doivent être dits à cet endroit concernant la stabilité des caractéristiques des diverses souches.

La mutation *A* (blanche) \leftarrow *a* (rouge) semble être extrêmement rare : nous n'avons observé qu'une seule fois, au cours de très nombreux étalements, l'apparition d'un mutant rouge. La mutation réverse est au contraire très fréquente et la forme *A* possède, en milieu liquide, un avantage sélectif très net sur *a*.

Nous ne possédons aucune donnée sur la fréquence de la mutation *T* \rightarrow *t*. La mutation réverse peut facilement être observée sur un milieu déficient en thiamine.

Les mutations des signes, à en juger par la rareté des « diploïdisations illégitimes », paraissent être très peu fréquentes dans nos souches.

Enfin, la réversion : « petite » \rightarrow « grande » n'a jamais été observée dans les souches utilisées dans les croisements décrits dans ce travail.

TECHNIQUE DES CROISEMENTS. — Lorsqu'un croisement est entrepris, les cultures, habituellement gardées sur du milieu à l'eau de touraillons gélosé (*cf.* Ephrussi, Hottinguer et Chimenes, 1949), sont repiquées dans un milieu liquide de composition semblable et, après vingt-quatre heures de culture à 25°, quelques gouttes de chacune des cultures à croiser sontensemencées dans un tube contenant 1 cm³ du même milieu. Les tubes sont portés à 17° pendant douze à quinze heures, puis à l'étuve à 25° pendant quarante-huit heures. Après cette incubation, au cours de laquelle se font les copulations, quelques gouttes du culot sont étalées sur le milieu de Gorodkowa (1908) et les tubes placés à 25°. Dans ces conditions la formation d'asques s'observe au bout de trois à six jours, selon les souches. Chaque croisement comporte deux témoins : les deux souches parentales traitées séparément de la manière qui vient d'être décrite.

ISOLEMENT DES ASCOSPORES. — Les asques sont disséqués, par groupes de 7, dans la chambre humide de Winge à l'aide du micromanipulateur de Fonbrune. Les ascospores sont isolées dans des gouttelettes du milieu à l'eau de touraillons où elles germent pour donner naissance, le plus souvent au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures, à des petites cultures. Deux à trois jours après la dissection, on prélève à la pipette celles qui appartiennent à des asques dont toutes les spores ont germé et proliféré et on les dépose à la surface du milieu gélosé, en tubes à essai, où elles sont gardées jusqu'au moment de leur utilisation dans les divers tests.

Les pourcentages des germinations seront donnés plus bas. Le nombre de cultures perdues pendant le transfert sur gélose est négligeable. Notre analyse ne portera que sur ceux des asques dont toutes les spores ont proliféré et engendré des clones sur milieu gélosé.

Sauf dans le cas d'une étude particulière, dont les résultats seront donnés dans l'annexe, nous ne disséquons que les asques à quatre spores, laissant de côté les nombreux asques à 1, 2 et 3 spores qui abondent dans la majorité de nos cultures sporulantes.

DÉTERMINATION DES IDIOTYPES. — La détermination des « signes » des différentes spores isolées est faite par croisement des clones auxquelles elles donnent naissance avec les souches 276/3 B et 276/3 D. Ces croisements sont effectués de la manière décrite dans le paragraphe précédent. A titre de témoin, la souche dont le « signe » doit être déterminé est en outre placée sur le milieu de Gorodkowa toute seule.

La présence d'asques dans un seul des trois tubes indique le

« signe » de la souche. Leur présence dans les trois tubes est preuve de « diploïdisation illégitime ».

Les besoins en facteurs de croissance, c'est-à-dire la présence des gènes *A* et *T*, sont déterminés par la culture sur des milieux synthétiques avec et sans addition d'adénine et de thiamine.

Le milieu de base, ou *milieu A*, utilisé dans ces expériences, a la constitution suivante :

SO ₄ Mg, 7H ₂ O	0,7 g.
KH ₂ PO ₄	1,0 g.
CaCl ₂	0,4 g.
NaCl	0,5 g.
SO ₄ (NH ₄) ₂	0,6 g.
FeCl ₃ à 1 p. 100	0,5 cm ³
Dextrosol	10,0 g.
Eau bidistillée sur Pyrex	Q. S. 1.000 cm ³

La solution est traitée cinq minutes à l'ébullition par 0,5 g. de noir animal et, après refroidissement et filtration, est additionnée de 2 p. 100 de Bacto-Agar Difco préalablement lavé. Elle est ensuite stérilisée par autoclavage dans des fioles d'Erlenmeyer couvertes de béciers renversés et enfin répartie stérilement par fractions de 5 cm³ dans des tubes à essai stériles. Le pH de ce milieu est 4,2.

Les expériences sont réalisées de la façon suivante. Une anse de la levure à examiner est mise en suspension dans 5 cm³ d'eau physiologique stérile. Trois lavages successifs par décantation sont effectués et une goutte de la suspension estensemencée sur chacun des cinq milieux suivants, contenus dans des tubes à essai :

A : milieu A ;

B : milieu A + 2 mg. de β-alanine et 0,2 γ de biotine par litre ;

C : milieu B + 80 γ de thiamine par litre ;

D : milieu B + 10 mg. d'adénine par litre ;

E : milieu B + 80 γ de thiamine et 10 mg. d'adénine par litre (3).

Les cultures sont placées à 25° et les résultats enregistrés quatre jours plus tard.

Les races de levures étudiées requièrent toutes la présence de β-alanine et de biotine. Aucune croissance ne s'observe donc sur le milieu de base (tube A). Les lignées qui prolifèrent dans les tubes B, C, D et E sont *AT* ; celles qui ne prolifèrent que dans les tubes C et E sont *At* ; les souches *aT* ne forment de culture que dans les tubes D et E ; enfin, la croissance dans le tube E seul indique le génotype *at*.

(3) Les facteurs de croissance sont ajoutés au milieu A avant l'autoclavage.

Celles enfin qui portent à la fois *A* et *T* prolifèrent également sur le milieu B (4).

Ce test différencie sans ambiguïté les génotypes *A* et *a*. La distinction des souches portant *T* et *t* est quelquefois plus délicate : dans 3 p. 100 environ des cas on ne peut sans hésitation classer les spores dans l'une des catégories *T* ou *t*. Ces difficultés proviennent du fait que les souches en question prolifèrent lentement, de sorte qu'elles ne forment que des cultures très pauvres dans le délai standard, mais montrent quelquefois une bonne croissance au bout de sept à huit jours.

Dans nos premières expériences le *diagnostic du caractère « grande » et « petite »* était réalisé de deux façons : détermination du QR par la méthode de Warburg et réaction du « Nadi ». Les deux tests ont, sans aucune exception, fourni des résultats concordants. C'est pourquoi nous avons plus tard abandonné les déterminations du quotient respiratoire et nous nous sommes bornés au test plus simple du « Nadi ». Celui-ci est effectué sur des levures ayant proliféré pendant cinq à six jours sur milieu gélosé dans des boîtes de Petri, à 25°.

La technique de la réaction du « Nadi » sera décrite dans le mémoire V.

Résultats expérimentaux.

I

CROISEMENTS PARENTAUX.

Deux croisements entre « grandes » et « petites » furent réalisés :

1° « Grande blanche » 276/3 *D(AT+)* × « petite rouge » 1*A* (*at—*) : 16 asques analysés ;

2° « Grande blanche » 276/3 *D(AT+)* × « petite rouge » 1*sp* (*at—*) : 15 asques analysés.

Les hybrides diploïdes forment des colonies blanches : *blanc* est donc dominant sur *rouge*. La dominance de *A* sur *a* et de *T* sur *t* a été établie sur l'hybride du premier croisement. La souche diploïde donne par ailleurs une réaction du « Nadi » positive : le caractère « grande » se comporte donc comme un caractère dominant.

Au total, 31 asques résultant des deux croisements parentaux

(4) Un grand nombre de déterminations de *A/a* ayant montré que le phénotype rouge est une manifestation du gène *a*, nous n'avons, par la suite, pour simplifier les tests, ensemencé les souches rouges que sur les milieux A, D et E et les souches blanches sur A, B et C. Dans ces conditions, seul *A* est directement déterminé. Dans les tableaux, le symbole du gène *a* est, bien entendu, omis dans les cas où sa présence est inférée à partir de la seule présence de pigment rouge.

ont été étudiés. La « légitimité » des croisements, dont les résultats sont donnés par les tableaux I et II, est attestée par : la présence, dans ces asques, avec une seule exception (asque 112-1), à la fois des gènes *A* et *a* et la présence simultanée dans tous les asques, sauf un (171-1), des gènes *T* et *t*. La ségrégation de *A* et *a* est dans le rapport 2 : 2 dans 28 asques. Celle de *T* et *t* donne le même rapport dans 22 cas. Enfin, les signes ont subi une ségrégation régulière 2 : 2 dans 28 asques. Dans les 3 asques restants,

TABLEAU I. — Résultats de l'analyse des asques de l'hybride du croisement « grande blanche » 276/3 D (AT +) × « petite rouge » 1 A (at -).

ASQUE	SPORE			
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
88.	(R) at -	(R) at +	At -	AT +
96.	(R) at +	At -	AT -	(R) aT +
100.	(R) aT -	(R) aT -	At +	At +
103.	AT +	AT -	(R) at +	(R) at -
105-1.	(R) aT +	(R) a -	At +	AT -
105-3.	At +	At -	(R) aT +	(R) aT -
105-4.	(R) at -	AT +	(R) aT -	At +
106.	(R) at +	AT -	(R) at -	AT +
107.	AT -	AT +	(R) at -	(R) at +
108.	(R) aT -	(R) at +	At -	AT +
109-1.	ATD	(R) atD	AT +	AT +
109-2.	At -	AT -	(R) at +	(R) aT +
109-3.	(R) at -	AT +	(R) at -	AT +
110-2.	(R) at +	(R) aT -	At +	AT -
110-3.	(R) at -	ATD	AT +	ATD ?
112-1.	AT -	At +	AT +	ATD ?

D, Clone diploïde ; En caractère gras : « petites » ; (R), phénotype rouge.

la diploïdisation des clones (indiquée par D dans les tableaux) n'a pas permis de déterminer la ségrégation des signes.

L'ensemble de ces résultats ne laisse pas de doute que nous avons affaire à des hybrides légitimes. Les deux exceptions signalées plus haut peuvent être attribuées à des mutations.

Qu'advient-il dans ces croisements du caractère « petite colonie » ?

L'examen des tableaux I et II montre que, sur un total de 124 spores étudiées, ce caractère n'est apparu que dans les clones fournis par 3 spores. Notons pour l'instant seulement qu'elles tirent toutes leur origine d'un même asque, 115-3, dont la signification sera discutée plus loin.

Ces faits ne sont certainement pas compatibles avec une diffé-

TABLEAU II. — Résultats de l'analyse des asques de l'hybride du croisement « grande blanche » 276/3D (AT+) × « petite rouge » 1sp (at-).

ASQUE	SPORE			
	a	b	c	d
115-1.	(R) at +	(R) at -	AT +	AT -
115-2.	(R) at +	(R) at -	AT -	At +
115-3.	(R) at -	at -	AT +	AT +
116.	(R) at +	(R) at +	AT -	AT -
119.	AT +	(R) at -	(R) at -	AT +
166-1.	(R) T +	AT -	At -	(R) t +
166-2.	(R) T +	AT -	(R) t +	At -
166-3.	(R) t -	(R) T +	AT -	AT +
167-1.	(R) t -	AT +	(R) T -	AT +
167-2.	AT -	(R) T +	(R) t +	At -
171-1.	At +	(R) t -	At +	(R) t -
171-2.	(R) t +	At -	AT -	(R) T +
171-3.	At -	(R) T +	(R) t +	At -
172-1.	(R) t +	At -	AT -	(R) T +
172-2.	At -	(R) t +	(R) T +	AT -

Voir légende du tableau I.

rence monofactorielle entre « grandes » et « petites ». Si ces deux formes différaient par une paire de gènes mendéliens, le caractère mutant devrait réapparaître dans deux spores de chacun des asques.

Sont-ils compatibles avec une interprétation difactorielle ? Si la différence entre « grandes » et « petites » résidait dans deux paires de gènes, les asques formés par l'hybride de première génération devraient appartenir à trois catégories caractérisées par les ségrégations (a) 3 : 1, (b) 2 : 2 et (c) 4 : 0. S'il s'agissait de deux gènes non liés, la fréquence des asques du premier type serait fonction des distances des gènes aux centromères, le reste des asques se partageant également entre les catégories (b) et (c). S'il s'agissait de deux gènes liés, les asques du type (b) seraient plus nombreux que ceux du type (c).

Le type de ségrégation observée dans l'asque 115-3 (3 « petites » : 1 « grande ») suggère bien qu'elle pourrait être le résultat de l'intervention d'un crossing-over. Mais nous venons de voir que l'hypothèse digénique requiert que s'il se forme des asques à ségrégation 4 : 0, il doit y avoir aussi des asques à ségrégation 2 : 2. Or, d'une part, nous n'avons pas observé de ségrégation 2 : 2 : et, d'autre part, si la ségrégation dans l'asque 115-3 était due à un mécanisme digénique, les asques à ségrégation 4 : 0 devraient contenir 4 « petites » et non

4 « grandes », comme c'est le cas dans nos expériences. Nous pouvons ajouter dès maintenant que l'absence d'asques à 4 « petites » : 0 « grandes » empêche d'interpréter l'asque 115-3 comme résultant de la ségrégation de plus de deux paires de gènes. Dans ce qui suit, nous allons donc faire abstraction de cet asque, que nous considérons comme un cas aberrant.

Mais si on élimine l'asque 115-3, l'absence de ségrégation dans les asques du croisement étudié demeure incompatible avec une interprétation digénique, à moins qu'on invoque des hypothèses supplémentaires. Celles-ci peuvent être de deux sortes :

A. — Supposons que le caractère « petite colonie » dépend de la présence simultanée de deux récessifs liés et qu'au cours de la méiose, il y a deux *crossing-over obligatoires* et complémentaires entre ces gènes. Comme, par définition, la présence d'un seul dominant suffit pour que la cellule qui le contient soit une « grande », les quatre spores formées par le mécanisme postulé seront des « grandes », puisque chacune portera un dominant.

Si l'hypothèse qui vient d'être formulée était exacte, le « backcross » d'un clone quelconque de première génération à un clone de « petites » devrait révéler une différence monogénique par la ségrégation simple 2 : 2 dans tous les asques de deuxième génération.

Les résultats des « backcross » seront décrits dans les paragraphes suivants.

B. — On pourrait supposer, d'autre part, que la non-apparition de « petites » dans la descendance des croisements parentaux est due à la sélection consciente ou inconsciente d'asques.

La valeur et les conséquences de cette hypothèse seront examinées dans la Discussion.

PREMIER « BACKCROSS ».

Le premier « backcross » a été effectué en croisant la souche dérivée de la spore 166-d (« grande » de constitution $AT +$) avec la souche parentale 1A2 (« petite », $at-$). Vingt-trois asques ont été analysés. Comme le montre le tableau III, la ségrégation des signes et de la paire de gènes A et a , a été dans le rapport simple 2 : 2 dans tous les asques. La ségrégation de T et t n'a donné ce même rapport que dans 16 asques ; dans les 7 asques restants, le rapport $3t : 1T$ a été trouvé. Ces constatations témoignent, encore une fois, du caractère « légitime » du croisement. Cependant, sur les 92 spores étudiées, seulement une (140-3b) a donné naissance à un clone de « petites ».

Les résultats du premier « backcross » ne fournissent donc aucun appui à l'hypothèse du « crossing-over obligatoire » formulée plus haut.

TABLEAU III. — Résultats de l'analyse des asques du premier « backcross » : « grande blanche » 106 d (AT +) × « petite rouge » 1 A (at -).

ASQUE	SPORE			
	a	b	c	d
140-1.	AT +	At -	(R) at -	(R) at +
140-2.	At +	(R) at +	AT -	(R) at -
140-3.	AT -	at +	(R) at +	AT -
141.	AT -	(R) at +	(R) at -	AT +
142-1.	(R) at -	(R) at +	At -	At +
142-2.	(R) at -	(R) at +	AT +	AT -
143.	At +	At -	(R) at +	(R) at -
144-1.	(R) at +	(R) at +	At -	AT -
144-2.	(R) at -	(R) at -	AT +	AT +
14-1.	AT +	(R) at -	(R) at -	At +
145-2.	(R) at +	AT -	(R) at +	AT -
146.	(R) t -	(R) t +	AT +	AT -
147-1.	(R) t +	At -	(R) T -	At +
147-2.	(R) t -	(R) T +	AT +	At -
149.	(R) t +	(R) t -	AT -	AT +
150.	AT +	AT -	(R) t -	(R) t +
151-1.	(R) t +	(R) t +	AT -	AT -
151-2.	(R) t -	(R) T +	At +	AT -
151-3.	AT -	At -	(R) t +	(R) T +
151-4.	AT -	(R) t -	(R) T +	At +
152-1.	AT -	AT +	(R) t +	(R) t -
152-2.	(R) t -	(R) T +	At -	At +
156.	(R) T +	At +	(R) t -	At -

Voir légende du tableau I.

LES « BACKCROSS » 2, 3 et 4.

Les résultats jusqu'ici présentés ne sont donc pas compatibles avec la détermination mono- ou digénique du caractère « petite colonie ». Par contre, ils sont manifestement compatibles avec un mécanisme polygénique. Si l'on suppose, par exemple, que ce caractère dépend de 4 gènes récessifs non liés entre eux, et assez proches des centromères pour qu'il n'y ait pas de crossing-over appréciable entre ces gènes et les centromères correspondants, on ne devrait observer la ségrégation 2 : 2 que dans 12,5 p. 100 des asques, les autres 87,5 p. 100 étant du type 4 : 0. Dans cette hypothèse, nous aurions donc dû trouver en F₁, environ 3 asques à ségrégation 2 « grandes » : 2 « petites ». C'est là une proportion qui a encore des chances considérables de ne pas être représentée dans un échantillon aussi restreint.

On peut en dire autant du premier « backcross ». Pour l'effectuer, nous avons pris au hasard une des spores AT+ de la F₁. Nous avons ainsi des chances considérables de choisir une spore

contenant plusieurs dominants, et des chances non négligeables d'en prendre une qui contient autant de dominants que sa « mère ». Rien d'étonnant alors que le caractère « petite colonie » ne réapparaisse pas dans le premier backcross, ou ne réapparaisse que dans une spore sur 92, comme c'était le cas dans les expériences qui viennent d'être décrites.

L'interprétation polygénique ne peut être mise à l'épreuve qu'en effectuant plusieurs « backcross » successifs.

Nous avons réalisé, au total, quatre backcross, dont le premier a été décrit dans le paragraphe précédent. Dans chacun de ceux-ci, nous avons croisé un clone de génotype *AT* + avec la souche 1A2 (*at*—). Les résultats des backcross 2, 3 et 4 sont donnés en détail dans les tableaux IV, V et VI et sont résumés dans le tableau VII.

TABEAU IV. — Résultats de l'analyse des asques du deuxième backcross : « grande blanche » 140-1 a (*AT* +) × « petite rouge » 1A (*at*—).

ASQUE	SPORE			
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
154-1.	(R) <i>t</i> +	(R) <i>T</i> +	<i>At</i> —	<i>AT</i> —
154-2.	<i>At</i> —	(R) <i>t</i> —	(R) <i>T</i> +	<i>AT</i> +
155-1.	(R) <i>T</i> +	(R) <i>T</i> —	<i>At</i> —	<i>At</i> +
155-2.	<i>AT</i> +	<i>At</i> —	(R) <i>t</i> +	(R) <i>t</i> —
157-1.	<i>AT</i> —	<i>At</i> —	(R) <i>T</i> +	(R) <i>t</i> +
157-2.	<i>At</i> +	<i>AT</i> —	(R) <i>t</i> +	(R) <i>t</i> —
157-3.	(R) <i>T</i> +	(R) <i>t</i> +	<i>At</i> —	<i>AT</i> —
157-4.	<i>AT</i> —	<i>At</i> —	(R) <i>T</i> +	(R) <i>t</i> +
158-1.	(R) <i>t</i> —	<i>AT</i> +	(R) <i>t</i> —	<i>AT</i> +
158-2.	(R) <i>t</i> +	<i>At</i> —	<i>At</i> —	(R) <i>T</i> +
158-3.	(R) <i>t</i> +	<i>AT</i> —	<i>AT</i> —	(R) <i>t</i> +
159-2.	(R) <i>t</i> +	<i>At</i> +	R. <i>T</i> —	<i>At</i> —
159-3.	<i>At</i> +	(R) <i>T</i> +	<i>AT</i> —	(R) <i>t</i> —
159-4.	(R) <i>t</i> —	<i>At</i> +	<i>AT</i> +	(R) <i>T</i> —
160-1.	(R) <i>t</i> —	<i>AT</i> —	<i>At</i> +	(R) <i>t</i> +
160-2.	<i>At</i> —	(R) <i>T</i> +	<i>At</i> +	(R) <i>T</i> —
160-3.	<i>At</i> +	(R) <i>t</i> —	(R) <i>T</i> —	<i>AT</i> +
160-4.	<i>At</i> —	(R) <i>t</i> +	<i>At</i> +	(R) <i>t</i> —

Voir légende du tableau I.

Encore une fois donc, la « légitimité » des asques étudiés ne fait pas de doute, vu la présence simultanée de gènes marqueurs introduits par les deux parents. Et cependant le caractère « petite colonie » n'est réapparu que dans 1 des 95 asques étudiés des 2^e, 3^e et 4^e « backcross » (spore 198-2d du 4^e backcross). Il est donc clair que les quatre « backcross » étudiés n'ont pas

TABLEAU V. — Résultats de l'analyse des asques du troisième back-cross « grande blanche » 154-2 d (AT +) × « petite rouge » 1A (at -).

ASQUE	SPORE			
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
162-1.	AT +	(R) t -	(R) T -	At +
162-2.	AT -	(R) t +	At +	(R) T -
163-1.	AT -	(R) t +	At +	(R) T -
163-2.	AT -	(R) T +	(R) t -	At +
163-3.	(R) t +	AT -	AT -	(R) t +
163-4.	AT +	At +	(R) T -	(R) t -
163-5.	(R) t -	(R) t +	At -	At +
164-1.	At -	At +	(R) T -	(R) T +
164-2.	AT +	(R) t +	(R) t -	AT -
164-3.	At -	AT +	(R) T -	(R) t +
164-5.	AT +	AT -	(R) t +	(R) t -
164-6.	AT -	(R) t -	(R) T +	At +
16-1.	At -	(R) t +	AT +	(R) T -
165-2.	AT +	(R) t +	(R) T -	At -
165-3.	(R) T +	At +	(R) T -	At -
168-1.	AT +	(R) t -	At -	(R) T +
169-1.	(R) t -	AT +	AT +	(R) t -
169-2.	(R) T +	(R) T -	At -	At +
170-1.	(R) t -	(R) T +	AT +	At -
170-2.	(R) t +	At -	AT -	(R) T +

Voir légende du tableau I

amené une diminution du nombre de dominants telle que la spore 163-4a, choisie pour le 4^e backcross, n'en contienne plus qu'un seul ou deux.

Discussion.

La conclusion à laquelle nous sommes arrivés à la fin du paragraphe précédent conduit à poser la question : *de quel nombre minimum de dominants avons-nous dû partir pour aboutir, avec un degré raisonnable de vraisemblance, aux résultats que nous avons enregistrés ?*

Dans ce qui suit, nous allons essayer de trouver une limite inférieure à ce nombre en partant de diverses hypothèses. On peut envisager *a priori* que la non-apparition de « petites » (ou leur rareté) est due, soit à la limitation des échantillons examinés, soit à une sélection, consciente ou inconsciente, des spores.

TABLEAU VI. — Résultats de l'analyse des asques du quatrième backcross : « grande blanche » 163-4a (AT +) × « petite rouge » (at —.)

ASQUE	SPORE			
	a	b	c	d
173-1.	(R) T —	(R) T +	At +	At —
173-2.	(R) T —	AT +	At —	(R) t +
173-3.	(R) T +	At +	At —	(R) T —
174-1.	AT —	(R) t —	(R) t +	AT +
174-2.	(R) T —	(R) T —	At +	At +
174-3.	(R) T +	(R) T +	At —	At —
175-1.	(R) t —	At +	(R) T —	AT +
175-2.	(R) T —	At +	At +	(R) T —
175-3.	AT —	At +	(R) t —	(R) T +
175-4.	(R) T —	AT +	(R) t —	At +
175-5.	(R) t —	(R) T —	AT +	At +
175-6.	(R) T —	(R) T +	At +	At —
176-1.	(R) T —	At +	At +	(R) T —
176-2.	(R) t —	AT —	(R) t +	AT +
176-3.	AT +	(R) T +	(R) t —	At —
176-4.	At —	(R) T +	AT —	(R) t +
176-5.	(R) t +	(R) t —	AT +	AT —
177-1.	(R) T —	(R) t +	AT —	At +
177-2.	(R) t +	(R) T —	AT —	At +
177-3.	(R) t —	At +	(R) T +	AT —
177-4.	(R) t —	AT +	(R) T +	At —
188-1.	AT	(R) T	At	(R) t
188-2.	At	(R) T	AT	(R) t
188-3.	AT	(R) T	At	(R) t
188-4.	(R) t	(R) t	AT	AT
188-5.	AT	At	(R) T	(R) t
188-6.	At	(R) T	(R) T	At
188-7.	At	(R) T	(R) T	At
193-2.	(R) t	AT	At	(R) T
193-3.	(R) t	At	At	(R) T
193-7.	(R) t	At	AT	(R) T
194-1.	(R) t	(R) AT	At	T
194-2.	AT	At	AT	(R) t
194-3.	At	(R) t	AT	(R) T
194-4.	(R) t	At	AT	(R) T
194-5.	AT	(R) T	(R) t	At
196-2.	At	(R) T	(R) t	AT
196-4.	AT	(R) t	At	(R) T
196-6.	AT	(R) t	(R) T	At
196-7.	AT	(R) t	At	(R) T
197-1.	AT	AT	(R) t	(R) t
197-2.	(R) t	At	(R) T	AT
197-3.	At	(R) T	(R) T	At
197-4.	(R) t	(R) t	AT	AT
198-1.	AT	At	(R) t	(R) T
198-2.	(R) T	At	(R) T	at
198-3.	AT	AT	(R) t	(R) t
198-4.	At	(R) T	AT	(R) t
198-5.	(R) t	AT	(R) t	AT
198-6.	AT	(R) t	At	(R) T

Voir légende du tableau I.

ASQUE	SPORE			
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
198-7.	At	(R) T	(R) t	AT
200-1.	At	(R) T	(R) T	At
200-2.	AT	(R) T	At	(R) t
200-3.	At	(R) T	AT	(R) t
200-4.	(R) t	AT	At	(R) T
200-5.	(R) t	At	(R) T	AT
200-6.	At	(R) T	(R) T	At

TABLEAU VII. — Résumé de l'analyse des asques.

	PREMIER croisement	BACKCROSS				TOTAL
		1	2	3	4	
Nombre d'asques analysés.	21	23	18	20	57	149
Ségrégation 2+ : 2—	28 (1)	23	18	20	21 (2)	110
Ségrégation 2A : 2a	28	23	18	20	55	144
Ségrégation 1A : 3a	0	0	0	0	1	1
Ségrégation 3A : 1a	2	0	0	0	1	3
Ségrégation 4A : 0a	1	0	0	0	0	1
Ségrégation 2T : 2t	22	16	12	19	56	125
Ségrégation 3T : 1t	5	0	0	0	0	5
Ségrégation 1T : 3t	3	7	5	0	1	16
Ségrégation OT : 4t	1	0	1	1	0	3
Nombre de spores	124	92	72	80	228	596
Grandes	121	91	72	80	227	591
Petites	3	1	0	0	1	5

(1) Les trois asques contenant des spores diploïdes (tableau I) n'ont pas été pris en considération pour la ségrégation des signes.
(2) Les signes n'ont été déterminés que dans 21 asques du backcross 4.

I. — Non-apparition des « petites » due à la limitation des échantillons.

1° L'hypothèse la plus pessimiste consiste : a) à admettre que, dans chaque génération, nous avons eu la malchance de prendre pour le « backcross » justement une spore qui contenait tous les dominants de l'hybride ; β) à tenir compte du fait qu'au cours des croisements, il est apparu effectivement des spores « petites ». On se souvient que 5 « petites » ont été trouvées sur un total de 596 spores. Trois tirent leur origine du même asque et, d'après ce qui a été dit plus haut, ne peuvent correspondre à une ségrégation normale. Mais, à la suite du 1^{er} et du 4^e backcross,

2 asques ont été rencontrés, qui contenaient chacun 3 spores « grandes » et une « petite ». Ils peuvent, *a priori*, correspondre à des ségrégations.

Dans cette hypothèse, les 596 spores examinées doivent donc être considérées comme appartenant toutes à la première génération (F_1) et 2 « petites » ont été rencontrées. Si N est le nombre de gènes dominants dans la forme « grande », la fréquence de formation d'une spore récessive est $\frac{1}{2^N}$. Donc, si n représente le nombre de spores effectivement examinées, la probabilité de ne rencontrer parmi elles pas plus de 2 récessives est :

$$P = \left(1 - \frac{1}{2^N}\right)^n + n \frac{1}{2^N} \left(1 - \frac{1}{2^N}\right)^{n-1} + \frac{n(n-1)}{2 \cdot 2^{2N}} \left(1 - \frac{1}{2^N}\right)^{n-2}.$$

La valeur de N , qui donne à cette expression la valeur 0,05 représente le nombre minimum de gènes nécessaires pour que le résultat trouvé reste vraisemblable. Avec $n = 596$, on trouve $N = 16$.

Donc, dans cette hypothèse, les formes normale et mutante devraient différer par 16 paires de gènes au moins.

2° Mais cette estimation fournit évidemment une limite très inférieure. D'une part, en effet, l'assimilation à une ségrégation des deux asques 3 : 1 rencontrés est très invraisemblable, du fait de la présence, à la première génération, de l'asque à 3 récessives (115-3). Celle-ci ne pouvant pas, comme nous avons vu plus haut, être due à une ségrégation, il est probable que les deux autres relèvent d'un phénomène de même nature qui n'a rien à voir avec un mécanisme mendélien. C'est ce que nous admettrons dans une deuxième hypothèse.

D'autre part, il est également hautement invraisemblable que la spore choisie dans chaque génération de « backcross » pour obtenir la suivante soit justement une qui ait fortuitement conservé tous les dominants de la souche « grande » initiale. En assimilant, comme nous l'avons fait plus haut, toutes les spores à une population F_1 , nous avons volontairement négligé une grande partie de l'information fournie par l'expérience. L'estimation de la probabilité du résultat obtenu, compte tenu de la structure même de l'expérience, exige un calcul assez complexe. En effet, chaque génération provenant d'une spore unique choisie parmi la population précédente, la probabilité de n'y point rencontrer de récessives n'est pas indépendante des résultats précédents. Le problème a été traité par L'héritier dans l'appendice.

Le calcul a été effectué au moment où seuls les résultats du croisement parental et des trois premiers « backcross » ont été connus (92 asques = 368 spores). Il indique que, si l'on admet

que « grandes » et « petites » diffèrent par 20 paires de gènes. nous n'avions que 5 chances sur 1.000 d'obtenir le résultat observé (non-réapparition des spores mutantes, supposées multiples récessives). Si on ajoute à cela le résultat du 4^e backcross, le nombre minimum de gènes qu'il faut invoquer pour obtenir, avec la même probabilité, le résultat que nous avons effectivement observé est encore plus élevé.

Remarquons toutefois que, contrairement à ce qui a été admis dans le calcul, les spores utilisées pour les « backcross » n'étaient pas prises au hasard dans l'ensemble des spores d'une génération, mais dans une seule des 8 classes de celle-ci : afin de pouvoir contrôler la « légitimité » de la génération suivante, nous avons toujours pris une spore de constitution *AT*+. Il est facile de se rendre compte que ce mode d'opérer n'affecte que de très peu le calcul du résultat précédent, même si l'on admet que certains des dominants des « grandes » sont liés aux gènes *A*, *T* et +.

II. — Non-apparition de « petites » par sélection d'asques.

Les calculs dont les résultats ont été donnés ci-dessus sont fondés sur l'hypothèse que l'absence (ou la rareté) des spores mutantes dans la descendance des hybrides a été fortuite. Mais on peut supposer, au contraire, qu'elle a été le fait de l'élimination sélective des asques dans lesquels la ségrégation a effectivement eu lieu.

1. Tel serait le cas, par exemple, si la ségrégation était suivie de la dégénérescence des spores mutantes ou de l'asque entier. Les asques que nous avons cherchés ne se formeraient donc jamais ou ne contiendraient jamais le complément normal de spores.

Il est clair que, dans le cas où un tel mécanisme serait en jeu, l'approche de l'homozygotie des hybrides au cours des « backcross » successifs entraînerait un accroissement progressif de stérilité. Les premières étapes de ce phénomène pourraient bien passer inaperçues, vu les fluctuations considérables que présente, selon les circonstances, la sporulation d'une souche donnée. Cependant, lorsque les deux souches, à la suite de croisements de retour répétés, viendraient à ne plus différer que par un seul couple de gènes, cet état de choses se signalerait immédiatement par la « stérilité totale » de leur hybride : nous entendons par là son incapacité de former des asques à quatre spores. A supposer que l'hypothèse discutée soit correcte, cet état de différence monogénique n'a, de toute évidence, pas été atteint au cours de nos expériences.

On peut fonder sur ce fait une estimation du nombre de gènes dont nous avons dû partir pour ne pas aboutir à la « stérilité totale » au bout de 5 générations. Il suffit, en effet, pour cela

que la spore choisie en F_4 pour réaliser le dernier « backcross » contienne au moins 2 gènes dominants. Or, si N est le nombre de dominants initial, l'ensemble des *pedigree* possibles doit aboutir en F_4 à des fréquences des différents nombres de dominants, qui sont les termes de la distribution binomiale :

$$\left(\frac{15}{16} + \frac{1}{16}\right)^N.$$

Sa probabilité de tomber sur une spore à 2 dominants au moins est donc :

$$P = 1 - \left(\frac{15}{16}\right)^N - \left(\frac{15}{16}\right)^{N-1} \frac{N}{16}.$$

En égalant cette expression à 0,05, on obtient 6 comme valeur minimum de N susceptible de rendre vraisemblable le résultat trouvé. Il faut remarquer d'ailleurs que P n'augmente que très lentement lorsque N s'accroît. Bien que 6 représente donc, strictement parlant, la limite inférieure de l'intervalle de confiance, la valeur probable de N est certainement beaucoup plus élevée. *Cette hypothèse bien différente aboutit donc à un résultat du même ordre de grandeur que les précédentes.*

Alors que le résultat de ce calcul corrobore ceux des calculs cités en 1-1 et 1-2, il ne nous dit rien de la vraisemblance de l'hypothèse de « sélection d'asques ». Est-il possible de la confirmer ou de l'infirmier par l'étude des asques anormaux ? (5)

Selon l'hypothèse formulée, l'intervention de la « stérilité totale » devrait être précédée par l'accroissement progressif du degré de stérilité au cours des « backcross ». On pourrait donc songer à en suivre l'évolution. Mais les fortes variations, déjà signalées, de la sporulation dans des conditions apparemment identiques et, surtout, l'abondance, dans les cultures sporulantes de toutes nos souches, d'asques à nombres anormaux de spores, indiquent que seules des statistiques extrêmement étendues pourraient fournir des résultats dignes de foi. A supposer que la ségrégation des spores mutantes soit suivie de leur dégénérescence, les asques à 2 et 3 spores ne viendraient grossir, aux dépens d'asques à 4 spores, que d'une fraction peu importante, au début. l'effectif d'asques anormaux normalement présents. Il va sans dire que, si les asques entiers devaient avorter du fait de la ségré-

(5) On trouvera dans l'annexe les résultats de l'analyse de 34 asques à 3 spores du croisement « grande » 276/3D \times « petite rouge » 1 sp. Cette analyse a été effectuée au moment où seuls les résultats des croisements parentaux étaient connus. Les résultats des « backcross » effectués depuis leur enlèvent beaucoup de leur intérêt au point de vue où nous nous plaçons dans cette discussion.

gation de « petites », l'évaluation de leur fréquence serait illusoire.

Le caractère problématique des résultats que l'on peut s'attendre à obtenir par les statistiques d'asques ne nous a pas paru justifier l'effort considérable que demande l'application de cette méthode. Par ailleurs, l'existence de souches qui produisent avec une fréquence élevée des ascospores mutantes (souches dont nous parlerons dans un autre travail) nous a fait considérer l'hypothèse discutée comme peu vraisemblable.

2. Une dernière modalité de sélection d'asques doit enfin être considérée. Parmi toutes les spores isolées, un certain pourcentage seulement germent et fournissent un clone. Comme nous l'avons dit au début de ce travail, nous n'avons prélevé et étudié que les clones qui ont pour origine des asques dont toutes les quatre spores ont germé et proliféré. Le pourcentage de tels asques a été de 58, 75, 81, 88 et 97 p. 100 dans le premier croisement 276/3D \times 1A et les 4 « backcross » successifs, respectivement. Supposons maintenant que les spores mutantes (« petites ») germent moins bien ou prolifèrent plus lentement que les spores normales : nous aurions systématiquement laissé de côté les asques dans lesquels la ségrégation pouvait être observée. Il est facile de voir que l'effet d'une telle sélection serait analogue à celui de la forme de sélection envisagée dans le paragraphe précédent : les rétrocroisements des spores qui avaient germé devraient, malgré tout, diminuer progressivement le nombre de dominants, et nous aurions dû arriver à une différence monogénique au bout d'un certain nombre de générations. Nous ne sommes pas arrivés à ce résultat après cinq croisements, ce qui indique que nous avons dû partir d'un nombre de dominants élevé.

Malgré le caractère rassurant de ce raisonnement, nous avons voulu évaluer la vraisemblance de ce mode de sélection inconsciente. A cet effet, 44 asques à quatre spores du 4^e « backcross » ont été disséqués et l'évolution des ascospores isolées a été suivie et notée de jour en jour. De plus, le prélèvement et le transfert sur gélose des cultures formées dans la chambre de Winge n'ont été effectués que lorsqu'il était certain que les spores qui n'avaient pas germé ne le feront plus. Les résultats de cette expérience (6) peuvent être résumés comme suit :

Nombre d'asques disséqués : $44 = 176$ spores.

Toutes les 4 spores ont germé dans 41 asques = 164 spores, dont 5 ont germé avec un retard d'au moins quarante-huit heures sur les autres. (Chacune de ces spores provenait d'un asque différent.)

(6) Inclus dans le tableau VI.

Dans chacun de 2 asques, 3 spores seulement ont germé ; la quatrième a dégénéré.

Dans 1 asque, 2 spores seulement ont germé, les 2 autres ont dégénéré.

Au total, 160 clones provenant de 40 asques dont toutes les 4 spores ont germé (y compris tous les retardataires) ont été transférés sur gélose. Cent cinquante-cinq ont donné des cultures sur ce milieu. Dans ce nombre se trouvent compris 4 des 5 « retardataires ».

Sur ce total de 155 lignées, 154 sont des « grandes », une seule est une « petite ». Cette « petite » unique n'est pas une « retardataire ».

Ces résultats constituent une garantie que la sélection inconsciente n'affecte pas les résultats du 4^e « backcross », où la proportion de « petites » devrait être la plus élevée.



Ainsi, quel que soit le mode de calcul adopté dans le cadre général des hypothèses purement géniques, on est toujours ramené à la conclusion que les formes normale et mutante de la levure étudiée diffèrent par un nombre considérable de paires de gènes (plus de 6 ou plus de 20, selon les calculs). Cette conclusion est cependant difficilement conciliable avec la haute fréquence de mutations spontanées : nous avons vu que toute population de levure de boulangerie contient 1 p. 100 environ de mutants apparemment identiques à ceux étudiés ici (Ephrussi, Hottinguer et Chimenes, 1949) et nous allons voir dans un prochain mémoire (Ephrussi, L'Héritier et Hottinguer, 1949) qu'à cette fréquence de mutants dans les populations en équilibre correspond un taux de mutations de l'ordre de 0,0025. Ce taux présenterait, d'ailleurs, des valeurs très voisines dans les lignées haploïdes et diploïdes. A moins d'invoquer la mutation « en bloc » d'un groupe de gènes, ceci revient à attribuer à chacun de ces derniers des taux de mutations spontanées supérieurs à 0,1. Autrement dit, dans une population de levures, la grande majorité des cellules porteraient, à chaque instant, la plupart des récessifs dont dépend le caractère « petite colonie » et seulement un ou deux dominants. Mais, dans ces conditions, les croisements que nous avons effectués auraient dû révéler une différence monogénique ou digénique entre les deux formes.

Il nous paraît donc peu vraisemblable que le déterminisme du caractère mutant étudié relève d'un mécanisme polygénique. Nous ne pensons pas non plus qu'il trouve son explication dans une aberration chromosomique banale quelconque ou dans un changement quantitatif du génome (polyploïdie, polysomie) : à notre

avis, toute configuration du génome, compatible avec un taux de mutation élevé, aurait dû être remplacée, au bout des cinq croisements, par celle qui caractérise la forme mutante.

Nous croyons donc plutôt que nous avons affaire à un cas d'hérédité cytoplasmique (7).

★★

Lindegren et Lindegren (1947) ont étudié, dans une souche haploïde rouge de *S. cerevisiae*, un mutant blanc qui paraît être semblable à notre mutant « petite colonie ». Les croisements de la lignée mutante avec des souches normales ont fourni des résultats essentiellement similaires aux nôtres.

Pour rendre compte de ces faits, Lindegren et Lindegren admettent que la mutation en question est due à « l'épuisement » d'un constituant d'un gène dont dépend la couleur rouge. Le croisement avec la forme normale restituerait ce constituant, par une sorte de « contamination » génique, d'où le retour à l'activité normale du gène et la disparition de la mutation.

Cette interprétation, apparentée à la théorie de la « conversion » de Winkler est, on le voit, en conflit avec des postulats fondamentaux du mendélisme : celui de la pureté des gamètes. Sans vouloir affirmer pour cela qu'elle ne comporte aucun élément de vérité, nous lui préférons une interprétation à peine plus orthodoxe, mais plus susceptible de vérification expérimentale.

Annexe.

1° « PETITES ROUGES. » — Dans les expériences décrites plus haut, nous avons, à plusieurs reprises, croisé la forme « grande blanche » à la forme que nous avons qualifiée de « petite rouge ». Cette dernière dénomination est justifiée, comme on a pu le voir, par la réapparition constante, dans la descendance de ce croisement, de clones à phénotype rouge et blanc dans un rapport mendélien simple 2 : 2 ; il est donc clair que les « petites rouges » portent bien le gène pour « rouge » et que celui-ci ne se mani-

(7) C'est seulement en supposant à la fois que la ségrégation de « petites » conduit à la « stérilité » des asques et que nous avons, pour chaque « backcross », pris une spore qui contenait tous les dominants de la génération précédente que l'on peut réconcilier le résultat observé avec un mécanisme trigénique. Mais cette double supposition nous paraît trop invraisemblable pour être prise en considération.

Nous ne nous arrêtons pas, d'autre part, sur l'hypothèse qu'il s'agit ici d'une « modification durable » (Dauermodifikation) car des croisements entre deux « petites », possibles dans une autre lignée, fournissent une descendance composée exclusivement de « petites ».

teste pas chez les « petites » dans les conditions décrites de culture. Ajoutons que dans des milieux spéciaux, dont il sera question ailleurs, les « petites rouges » peuvent former le pigment rouge et qu'en particulier les « petites » 115-3b et 140-3b ont été soumises à ce test.

2° EFFET PLÉIOTROPE DE *a*. — Le caractère rouge est une manifestation du gène *a*. En effet, la détermination de la faculté de synthèse de l'adénine, effectuée sur 354 clones blancs, dérivés des ascospores qui figurent dans les tableaux I à VI et VIII, a montré que 351 d'entre eux portent le gène *A*, les 3 autres étant des « petites rouges ». D'un autre côté, le même test effectué sur 71 clones rouges a indiqué la présence du gène *a* dans tous les 71 cas.

3° SÉGRÉGATION DES GÈNES MARQUEURS. — L'utilisation, dans nos croisements, de deux souches de levure marquées par les trois paires de gènes *A/a*, *T/t* et $+/-$, nous a permis de recueillir quelques renseignements sur les relations entre ces gènes.

A/a. — Sur 149 asques examinés, 144 ont présenté la ségrégation $2A : 2a$. Les cinq exceptions s'expliquent, soit par la mutation reverse $a \rightarrow A$, que nous savons fréquente (rapport $3A : 1a$ et $4A : 0a$), soit, très probablement, par une contamination au cours du prélèvement des cultures dans la chambre de Winge (asque 198-2 : $1A : 3a$) ; la rareté de la mutation $A \rightarrow a$ ne permet pas de lui attribuer la présence, dans cet aspect aberrant, de trois *a*.

Au total, dans tous les asques à 4 spores de tous les croisements réunis, nous avons trouvé 298 *A* et 239 *a* (8).

T/t. — Sur 149 asques provenant de tous les croisements successifs, 125 seulement ont montré une ségrégation simple $2T : 2t$. 24 autres ont montré des ségrégations différentes, qui sont résumées dans le tableau VII. Il y a lieu de remarquer que la plupart de ces asques ont été trouvées dans les trois premiers croisements. Dans les 3° et 4° backcross, la ségrégation $2T : 2t$ a été observée dans 75 asques sur 77. Ceci suggère au prime abord que les deux souches croisées différaient par deux paires de gènes polymères. Mais l'existence à la fois de ségrégations $3 : 1$ et $1 : 3$ s'oppose à cette interprétation. Nous sommes enclins à considérer que ces ségrégations aberrantes sont dues aux difficultés souvent rencontrées dans la détermination des besoins en thiamine. L'amélioration progressive de notre technique expliquerait la disparition d'asques anormaux. Il est à noter, par ailleurs, que le résultat global fait apparaître un excès de *t* dans les spores portant *a*. Parmi les spores *A*, les nombres de *T* et *t* sont, au contraire, sensiblement égaux.

(8) Ont été exclus de ces nombres les spores diploïdes.

Au total, dans tous les croisements réunis, les asques à 4 spores ont contenu 277 *T* et 314 *t* (8).

+/—. La détermination des signes dans 110 asques à 4 spores a montré une ségrégation régulière à 2+ : 2—.

4° RECHERCHE DE LIAISON ENTRE LES GÈNES MARQUEURS. — Les chiffres obtenus sur la fréquence des combinaisons entre les paires de gènes *A/a* et +/— ne fournissent aucune indication de liaison entre ces gènes :

<i>A</i> +	109	$\chi^2 = 0,516$	$P = 0,90-0,95.$
<i>A</i> —	117		
<i>a</i> +	113		
<i>a</i> —	108		

Ces déterminations portent sur l'ensemble des asques à 4 spores dans lesquels les signes des spores ont été déterminés.

Pour la recherche de liaison entre *A* et *T*, nous nous servirons encore de l'ensemble des spores étudiées, mais nous introduirons dans le calcul de χ^2 une correction. Nous avons vu (paragraphe 3 ci-dessus) que, parmi les spores *a*, on trouvait un excès de *t*. Nous corrigerons donc les nombres de spores *aT* et *at* en tenant compte de la fréquence réelle de *T* et *t*. Nous y sommes autorisés par le fait que *T* et *t* sont également fréquents dans les spores *A*, fait qui, du reste, à lui seul, suffirait pour affirmer l'absence de toute indication de liaison. Voici les résultats de ce calcul :

<i>AT</i>	151	$\chi^2 = 0,098$	$P = 0,95-0,98.$
<i>At</i>	147		
<i>aT</i>	126		
<i>at</i>	167		

A et *T* se comportent donc comme des gènes non liés.

Enfin, pour la recherche de liaison entre *T* et +, il nous suffira de considérer les spores *A* seules, dans lesquelles, comme nous venons de le voir, *T* et *t* sont également fréquents.

Nous trouvons :

<i>T</i> +	55	$\chi^2 = 0,509$	$P = 0,90-0,95.$
<i>T</i> —	61		
<i>t</i> +	54		
<i>t</i> —	56		

Encore une fois, donc, les deux gènes paraissent subir des ségrégations indépendantes.

5° ASQUES A TROIS SPORES. — Nous avons dit dans la Discussion (voir note p. 435) comment nous avons été amenés à examiner un certain nombre d'asques à trois spores du croisement « grande blanche » 276/3D × « petite rouge » 1sp. Les résultats détaillés

TABLEAU VIII. — Résultats de l'analyse des asques à trois spores du croisement « grande blanche » 276/3D (AT +) × « petite rouge » 1sp (at —).

ASQUE	SPORE		
	a	b	c
122-1	At —	(R) aT +	(R) at —
122-2	(R) at +	At —	(R) aT +
122-3	(R) at —	(R) aT +	AT +
123-1	(R) at +	AT —	(R) at +
123-2	AT —	At +	(R) aT +
124-1	(R) at +	At —	(R) aT +
124-2	AT —	(R) aT +	(R) at +
126-1	(R) T +	At +	At —
127-1	AT +	(R) t +	AT —
132-1	(R) t —	AT +	(R) T +
132-2	(R) t —	AT +	(R) T +
133-1	At +	(R) t —	At —
133-2	At —	(R) T +	At +
133-3	At —	(R) t +	(R) T +
133-4	AT —	At +	(R) t +
133-5	At —	At +	(R) T +
135-1	(R))T —	At —	AT +
135-2	At +	(R) t —	At —
136-1	At +	(R) T +	At —
136-2	(R) T +	At —	At +
136-3	At +	(R) T +	At —
136-4	(R) T —	(R) t +	At +
137-1	(R) T —	At —	AT +
137-2	(R) T +	AT +	At —
137-3	At —	AT +	(R) T —
137-4	(R) T +	(R) t —	AT —
137-5	At —	(R) T +	At +
137-6	(R) t —	(R) T +	AT —
138-1	AT +	(R) t —	(R) t —
138-2	At —	(R) t +	AT —
138-3	AT —	(R) T —	(R) t +
133-4	(R) T —	At +	(R) t —
139-1	At +	AT —	(R) t +
139-2	(R) T +	At —	At +

de cette analyse de 34 asques sont donnés dans le tableau VIII. Constatons que : a) toutes les 102 spores ont donné des clones de « grandes » ; b) les spores A et a, T et t, + et — sont en nombres sensiblement égaux : 53 A et 49 a, $\frac{d}{\sigma} = 0,4$; 45 T et 57 t, $\frac{d}{\sigma} = 1,2$; 56 + et 46 —, $\frac{d}{\sigma} = 1$. c) Les écarts entre les fréquences des 8 classes possibles de spores

AT +	9
AT —	10
At +	15
At —	19
aT +	20
aT —	6
at +	12
at —	11

$$\chi^2 = 13,138$$

$$P = 0,05-0,10.$$

ne sont probablement pas dus uniquement au hasard, mais peuvent être dus à une mortalité différentielle des spores.

Notons, pour terminer, qu'aucun des clones dérivés des ascospores isolées ne s'est diploïdisé. Cela nous autorise à penser que dans ces asques les 3 spores sont uninucléées et que la non-formation de la quatrième résulte de processus postérieurs à la méiose.

Résumé.

1° Afin de déterminer la nature génétique du mutant « petite colonie » de *S. cerevisiae* précédemment décrit, des croisements entre la forme normale et mutante, suivis de 4 backcross successifs à la forme mutante ont été effectués.

2° Au total, sur 596 ascospores examinées, 5 petites ont été trouvées. Trois de celles-ci proviennent du croisement parental, une du premier backcross et la dernière du quatrième backcross.

3° Ces faits ne sont compatibles avec un déterminisme mendélien que si l'on admet que les formes normale et mutante diffèrent par un nombre élevé de gènes (> 6 à 20). Une telle hypothèse semble être en contradiction avec la fréquence élevée des mutations spontanées. Il paraît peu probable qu'il s'agisse d'un cas d'hérédité cytoplasmique.

4° L'Annexe de ce mémoire contient quelques données sur les relations entre les gènes (*A/a*, *T/t*, +/—) ayant servi de marqueurs dans les croisements précédents.

BIBLIOGRAPHIE

- EPHURSSI (Boris), HOTTINGUER (Hélène) et CHIMÈNES (Anne-Marie). *Ces Annales*, 1949, **76**, 351.
- GORODKOWA. *Bull. Jardin imperial, Petersbourg*, 1908, VIII, 165 (cité d'après LANGERON).
- LINDEGREN (Carl C.) et LINDEGREN (Gertrude). *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1943, **29**, 306.
- LINDEGREN (Carl C.) et LINDEGREN (Gertrude). *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1947, **33**, 314.
- WINGE (O.). *C. R. Labor. Carlsberg*, 1935, **21**, 71.
- WINGE (O.) et LAUSTSEN (O.). *C. R. Labor. Carlsberg*, 1937, **22**, 99.
- WINKLER (H.). *Die Konversion der Gene*, Iena, 1930.

APPENDICE

CALCUL DE LA PROBABILITÉ DE NE PAS TROUVER
DE SPORES RECESSIVES AU COURS DES « BACKCROSS » SUCCESSIFS
D'UNE LEVURE A N DOMINANTS A UNE LEVURE
COMPORTANT TOUS LES ALLÈLES RÉCESSIFS

par PH. L'HERITIER.

(Institut de Génétique du C. N. R. S.
et Institut de Biologie physico-chimique, Paris.)

I. — Dans les expériences de Génétique réalisées sur des organismes supérieurs, l'échantillon de gamètes étudié peut être considéré comme tiré au hasard parmi tous les gamètes possibles. Dans le cas des levures et plus généralement des champignons, les spores sont examinées groupées par asques, c'est-à-dire que si le contenu de n asques est passé en revue, l'échantillon de 4 n spores examinées provient par groupes de 4 de n méïoses différentes.

Il importe donc, comme première étape du calcul, de se demander quelle perturbation ce groupement par asques apporte aux proportions mendéliennes, dans le cas du croisement envisagé d'une forme à N dominants à une forme comportant tous les allèles récessifs. Ceci nous sera donné par la comparaison des probabilités de ne pas rencontrer de spores récessives dans 4 spores prises au hasard d'une part, et dans un asque d'autre part.

1° CAS DE 4 SPORES PRISES AU HASARD. — Si les N gènes dominants subissent la ségrégation indépendante, la probabilité pour qu'une spore soit récessive est évidemment : $\frac{1}{2^N}$.

Donc, la probabilité pour que, parmi 4 spores prises au hasard, aucune ne soit récessive, est évidemment :

$$\left(1 - \frac{1}{2^N}\right)^4$$

c'est-à-dire approximativement :

$$1 - \frac{4}{2^N - 2}, \text{ dès que } N \text{ est grand.}$$

2° CAS DES 4 SPORES D'UN ASQUE. — La probabilité pour qu'un asque ne contienne pas de spores récessives va dépendre du comportement méiotique des gènes; ceux-ci peuvent, en effet, suivant leur position par rapport au centromère, subir soit la préréduction (séparation des 2 allèles dès la division hétérotypique), soit la postréduction (séparation des allèles à la division homéotypique).

a) On peut tout d'abord envisager le cas où tous les gènes subissent la préréduction obligatoire, c'est-à-dire où les loci sont près des centromères. Les deux spores d'un demi-asque sont alors nécessairement identiques, il ne peut donc y avoir que des asques à 0 ou à 2 spores récessives.

La fréquence de la première catégorie est :

$$1 - \frac{1}{2^{N-1}}.$$

β) Si, au contraire, la postréduction est obligatoire pour tous les gènes, il peut exister 3 catégories d'asques : à 0, à 1 ou à 2 spores récessives.

La probabilité pour que, dans un demi-asque, il n'y ait pas de spores récessives est alors la même que celle qui, dans le cas précédent, correspond à un asque entier, c'est-à-dire :

$$1 - \frac{1}{2^{N-1}}.$$

Donc, pour les deux demi-asques, elle est :

$$\left(1 - \frac{1}{2^{N-1}}\right)^2,$$

soit

$$1 - \frac{1}{2^{N-1}}, \text{ dès que } N \text{ est grand.}$$

γ) Les deux hypothèses précédentes constituent 2 cas extrêmes. Comme type d'une situation intermédiaire plus vraisemblable, on peut envisager le cas où chaque gène peut subir soit la préréduction, soit la postréduction avec des fréquences égales.

Il y a donc trois éventualités possibles pour le déroulement d'une méiose.

Ou bien tous les gènes sont préréduits, probabilité $\frac{1}{2^N}$, ou ils sont tous postréduits, probabilité $\frac{1}{2^N}$, ou certains sont préréduits, d'autres postréduits, probabilité

$$1 - \frac{1}{2^{N-1}}.$$

La probabilité pour ne pas rencontrer de spores récessives dans un asque est déjà connue par les calculs précédents pour les deux premiers cas. Le troisième cas peut être considéré en bloc, car à partir du moment où les deux catégories de gènes existent, il ne peut y avoir qu'une spore récessive par asque. La probabilité cherchée est alors indépendante des effectifs respectifs de ces deux catégories et égale uniformément à :

$$1 - \frac{1}{2^{N-2}}.$$

En définitive, compte tenu de toutes les possibilités, la fréquence totale des asques sans spores récessives, dans le cas où la post- et la préréduction sont également probables, est donnée par l'expression :

$$\left(1 - \frac{1}{2^{N-1}}\right) \left(1 - \frac{1}{2^{N-1}}\right) + \frac{1}{2^N} \left(1 - \frac{1}{2^{N-1}}\right) + \frac{1}{2^N} \left(1 - \frac{1}{2^{N-1}}\right)^2,$$

ou

$$1 - \frac{1}{2^{N-2}} + \frac{1}{2^{2N-1}} + \frac{1}{2^{2N-2}}.$$

Dès que N est grand, ceci est naturellement très sensiblement égal à :

$$1 - \frac{1}{2^{N-2}}.$$

3° COMPARAISON NUMÉRIQUE ET CONCLUSION. — Le tableau I montre, pour 1 à 5 gènes dominants, les probabilités de ne pas rencontrer de récessives soit dans 4 spores prises au hasard, soit dans un asque dans les trois éventualités envisagées ci-dessus.

TABLEAU I.

N	4 SPORES prises au hasard	ASQUE avec postréduction obligatoire	ASQUE avec post et préréduction également probables	ASQUE avec préréduction obligatoire
1	0,06	0	0	0
2	0,32	0,25	0,19	0,50
3	0,89	0,56	0,53	0,75
4	0,77	0,77	0,75	0,875
5	0,88	0,88	0,875	0,94

On voit que, dès que N est au moins égal à 2, seules les valeurs de la dernière colonne diffèrent appréciablement de celles de la première. Ce n'est que dans ce cas, au surplus, que l'assimila-

tion des 4 spores d'un asque à 4 spores collectées fortuitement conduit à sous-estimer la probabilité de ne pas rencontrer de combinaisons récessives, donc à surestimer le nombre de dominants nécessaires pour rendre probable, à un certain niveau, un résultat expérimental, dans lequel, effectivement, il n'a été trouvé que des spores dominantes.

La préréduction obligatoire pour tous les N gènes est évidemment très peu probable lorsque N est très grand ; elle le devient davantage, si N diminue. On peut alors faire la remarque suivante :

La probabilité pour qu'aucun asque ne renferme de récessives parmi n , dans lesquels N gènes dominants subissent la préréduction, est évidemment, d'après ce qui précède :

$$\left(1 - \frac{1}{2^N - 1}\right)^n$$

ce qui est sensiblement équivalent et toujours inférieur à :

$$\left(1 - \frac{1}{2^N}\right)^{2n}.$$

Or, cette dernière expression est la probabilité que $2n$ spores prises au hasard, soient toutes dominantes.

Donc, en définitive, pour ne pas surestimer le nombre de dominants nécessaires à expliquer un résultat expérimental, il suffit de considérer que n asques sont équivalents à $2n$ spores prises au hasard. C'est ce qui a été fait dans le calcul ci-dessous, à partir du moment où le nombre de dominants intervenant dans le croisement le justifie.

Remarque. Les calculs qui précèdent ne s'appliquent qu'au cas où les N gènes dominants subissent la ségrégation indépendante. Mais l'existence de liaisons entre certains de ces gènes ne peut que rendre plus probable l'apparition de spores récessives au cours des générations de « backcross ». Cette circonstance ne peut donc, dans aucun cas, amener à surestimer le nombre de dominants.

II. — Appelons, comme précédemment, N le nombre de gènes dominants contenus dans le clone initial, à partir duquel a été exécuté le premier croisement avec le clone supposé entièrement récessif. Soit n_1 le nombre de spores examinées comme résultat de ce premier croisement, n_2 le nombre examiné à la suite du premier « backcross », n_3 et n_4 à la suite respectivement du deuxième et du troisième « backcross ». Nous allons chercher à calculer quelle est la probabilité P , pour qu'aucune spore récessive ne soit rencontrée à aucun des étages de ces croisements. Si P_1, P_2, P_3, P_4 désignent les probabilités respectives pour que les n_1 spores de première génération (F_1), les n_2 de la deuxième

(F₂), les n_3 et n_4 des troisième (F₃) et quatrième (F₄) soient toutes dominantes, on a :

$$P = P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \cdot P_4.$$

Le calcul des deux premiers termes P_1 et P_2 ne présente pas de difficultés ; la spore particulière F_1 , qui a été choisie pour obtenir la génération F_2 , peut en effet être considérée comme prise au hasard dans la population F_1 , parmi laquelle la distribution des nombres de dominants est connue. Mais la génération F_3 a été obtenue à partir d'une unique spore F_2 et celle-ci n'est pas une spore quelconque prise parmi toutes les populations F_2 également possibles *a priori*, car nous savons qu'elle vient d'une F_2 dont n_2 échantillons, pris au hasard, se sont tous montrés dominants. Ayant déjà tenu compte de ce fait pour le calcul de P_2 , on doit considérer P_3 comme une probabilité liée à un résultat, c'est-à-dire une probabilité *a posteriori*. De même P_4 est une probabilité liée à la connaissance de l'ensemble des résultats antérieurs.

a) *Calcul de P_1* . — La probabilité d'une spore récessive en F_1 est évidemment :

$$\frac{1}{2^8}.$$

Donc la probabilité pour que les n_1 spores soient toutes dominantes est :

$$P_1 = \left(1 - \frac{1}{2^8}\right)^{n_1}.$$

Remarque. — Strictement parlant, cette expression n'est correcte que pour n_1 spores prises au hasard et non pour n_1 spores représentant le contenu de $\frac{n_1}{4}$ asques, comme dans le cas de l'expérience. Mais tant que N est grand, nous avons vu que cette circonstance ne change pratiquement pas la probabilité cherchée. Or N est sûrement grand en F_1 , F_2 et F_3 puisqu'il n'apparaît pas de récessives. Dans ces trois générations, le calcul des probabilités peut donc se faire en partant des nombres actuels n_1 , n_2 et n_3 spores, considérées comme récoltées au hasard. En F_4 , pour tenir compte du groupement par asques, le calcul sera fait à partir de $\frac{n_4}{2}$ spores.

β) *Calcul de P_2* . — Dans la génération F_1 , nous pouvons avoir des spores contenant de 0 à N gènes dominants, les probabilités des diverses éventualités étant les termes de la distribution binomiale :

$$\left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2}\right)^N = p'_0 + p'_1 + p'_2 + \dots + p'_N.$$

Si la spore choisie en F_1 avait k dominants, la probabilité liée à k d'avoir n_2 spores F_2 dominantes serait manifestement :

$$\left(1 - \frac{1}{2k}\right)^{n_2}.$$

P_2 est alors la somme pondérée de ces probabilités liées à k , étendue à toutes les valeurs de k .

$$P_2 = \sum_{k=1}^{k=N} p'_k \left(1 - \frac{1}{2k}\right)^{n_2} \frac{1}{1 - p'_0}.$$

Le facteur

$$\frac{1}{1 - p'_0}$$

doit s'introduire en toute rigueur, puisque la spore F_1 choisie n'était certainement pas récessive, mais N étant grand, p'_0 est tellement petit que

$$\frac{1}{1 - p'_0}$$

peut être considéré comme égal à 1.

γ) Calcul de P_3 . — Soient

$$p''_0, p''_1, p''_2, \dots, p''_k, \dots, p''_N,$$

les probabilités des divers nombres de dominants dans la population F_2 , d'où a été tirée la spore particulière qui a servi à obtenir la F_3 . On a alors, comme plus haut,

$$P_3 = \sum_{k=1}^{k=N} p''_k \left(1 - \frac{1}{2k}\right)^{n_3} \frac{1}{1 - p''_0}.$$

le facteur correctif

$$\frac{1}{1 - p''_0}$$

pouvant être négligé.

Mais pour le calcul des termes p''_k , il est nécessaire, comme il a été expliqué plus haut, de tenir compte du fait que la population F_2 , dont provient la F_3 , était constituée par n_2 spores, toutes actuellement dominantes. Il faut donc considérer que la probabilité que la spore F_2 choisie dérive d'une spore F_1 à k dominants n'est pas égale à p'_k , terme de la distribution *a priori* de la F_1 , mais est une valeur p'_{kc} , qui est une probabilité *a posteriori*, tenant compte du résultat F_2 .

D'après le théorème de Bayes, on a :

$$p'_{kc} = \frac{p'_k \left(1 - \frac{1}{2k}\right)^{n_2}}{\sum_{k=1}^{k=N} p'_k \left(1 - \frac{1}{2k}\right)^{n_2}} = \frac{p'_k \left(1 - \frac{1}{2k}\right)^{n_2}}{P_2}$$

A partir des termes p'_{kc} , la distribution de la F_2 se calcule en remarquant qu'une spore F_1 à k dominants fournit une spore F_2 à k' dominants avec la fréquence :

$$C_k \frac{1}{2^k}$$

k' ème terme de la distribution binomiale $\left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2}\right)^k$.

Donc

$$p''_{k'} = \sum_{k=k'}^{k=\infty} C_k \frac{1}{2^k} p'_{kc}.$$

2) *Calcul de P_4 .* — La distribution des nombres de dominants en F_2 , caractérisée par les termes $p''_{k'}$, est une distribution *a priori*, c'est-à-dire qu'elle ne tient compte que des faits antérieurs à la F_3 . Un raisonnement analogue à celui qui a été fait plus haut montre que pour calculer P_4 , il est nécessaire de partir d'une distribution *a posteriori* de la F_2 , dont les termes $p''_{k'cx}$ sont donnés par la relation :

$$p''_{k'c} = \frac{p''_{k'} \left(1 - \frac{1}{2^{k'}}\right)^{n_3}}{\sum_{k'=1}^{k'=\infty} p''_{k'} \left(1 - \frac{1}{2^{k'}}\right)^{n_3}} = \frac{p''_{k'} \left(1 - \frac{1}{2^{k'}}\right)^{n_3}}{P_3}.$$

A partir de ces termes, la distribution réelle de la génération F_3 se calcule comme précédemment. Si p'''_k est la fréquence de l'éventualité k gènes dominants, on a :

$$P_4 = \sum_{k=1}^{k=\infty} p'''_k \left(1 - \frac{1}{2^k}\right)^{n_4} \frac{1}{1 - p'''_0}.$$

Le facteur correctif

$$\frac{1}{1 - p'''_0}$$

n'est plus à ce niveau nécessairement négligeable. En outre, le nombre de spores examinées doit être divisé par deux pour tenir compte, comme il a été expliqué plus haut, du groupement par asques.

3) *Calcul numérique.* — On peut aisément déduire de ce qui précède l'expression de P en fonction de N . Malgré certaines simplifications, elle est très complexe et comporte une série de sommations en cascades. La valeur de N , qui donne à P la valeur 0,05, représente le nombre minimum de gènes dominants nécessaire pour rendre vraisemblable (au niveau de vraisemblance 5 p. 100) le résultat obtenu. Ce nombre correspondrait en somme à la limite inférieure d'un intervalle de confiance, dont la borne supérieure est manifestement infinie.

Etant donné, d'une part, la longueur des calculs et, d'autre part, le fait que seul l'ordre de grandeur de cette valeur nous intéresse, elle n'a pas été déterminée exactement. Nous nous sommes bornés à calculer la valeur de P pour $N = 20$ et, par souci de commodité, les nombres choisis pour n_1 , n_2 , n_3 et n_4 ont été respectivement 120, 80, 80 et 80, qui sont légèrement inférieurs aux nombres de spores réellement observées.

On trouve alors :

$$P_1 = 1,000$$

$$P_2 = 0,883$$

$$P_3 = 0,230$$

$$P_4 = 0,024$$

1

D'où pour P la valeur 0,005.

La limite inférieure de l'intervalle de confiance, au niveau 5 p. 100, est donc certainement très supérieure à 20.

A PROPOS DU MICRODOSAGE DU RIBOSE DANS LES ACIDES NUCLÉIQUES ET LEURS DÉRIVÉS

par MIRKO BELJANSKI.

(Travail du Laboratoire de Chimie biologique. Prof. MACHEBOEUF.)

La méthode de microdosage employée par de nombreux auteurs pour l'étude du ribose utilise la réaction bien connue de Bial, suivant les prescriptions de Mejbaum [1], puis de Albaum et Umbreit [2].

Le ribose, sous l'action d'acide chlorhydrique concentré et chaud, donne des composés furfuriques qui réagissent avec de l'orcinol en présence d'un sel ferrique pour donner une teinte verte. On effectue ensuite une lecture photo-absorptiométrique.

La transformation du ribose en dérivés furfuriques sous l'influence de l'acide chlorhydrique concentré et chaud avait été largement utilisée lors des recherches anciennes sur la structure des acides nucléiques et déjà Hoffmann [3], en 1947, avait remarqué que les nucléotides pyrimidiques donnaient un rendement très mauvais en furfural tandis que les nucléotides puriques donnaient un bon rendement (HCl à 20 p. 100). Ce fait a été négligé par Mejbaum qui, pour mettre au point sa microméthode quantitative n'étudia que des dérivés puriques. Albaum et Umbreit négligèrent également l'influence possible de la nature des bases des nucléotides.

On trouve cependant dans la littérature une brève observation de Grégoire [4] qui signale, sans insister, que l'acide ribonucléique qu'il étudie fournit par la méthode de Mejbaum un résultat qui ne correspond qu'à 50 p. 100 du chiffre théorique du ribose qu'il contient.

Au cours de recherches sur le métabolisme nucléaire des bactéries et sur l'action des antibiotiques sur ce métabolisme, nous avons essayé d'employer la microméthode de Mejbaum-Albaum et Umbreit et nos résultats ne furent pas satisfaisants. Nous avons donc repris l'étude de cette méthode.

En opérant sur des acides nucléiques aussi purifiés que possible, les résultats furent décevants ; on ne retrouvait que 50 p. 100 environ de ribose théorique. Pour chercher l'origine de cette considérable erreur, nous avons étudié séparément des mononu-

cléotides et des nucléotides préalablement isolés et purifiés. Certains étaient puriques, d'autres pyrimidiques.

Une conclusion très nette est apparue : lorsque l'on a affaire à un dérivé uniquement purique, la méthode de Meijbaum donne pour le ribose un résultat acceptable. Au contraire, lorsqu'il s'agit d'un dérivé pyrimidique, le résultat est totalement erroné : la teinte obtenue correspond seulement à une infime proportion du ribose théorique.

Enfin, si l'on s'adresse à un acide ribonucléique purifié ou bien à des tétranucléotides, le résultat fourni par la méthode de Meijbaum correspond seulement à 50 p. 100 environ de la théorie — comme si les nucléotides puriques étaient seuls capables de donner la réaction.

PROTOCOLE DE NOS EXPÉRIENCES.

TECHNIQUE DE LA RÉACTION. — Le dérivé nucléique étudié est mis en solution aqueuse de concentration connue (grâce à la petite quantité de soude nécessaire pour amener le pH au voisinage de 7,5).

3 millilitres de cette solution sont placés dans un tube à essai étroit dans lequel on ajoute :

1° 3 millilitres d'acide chlorhydrique concentré contenant 0,1 p. 100 de FeCl_3 .

2° 3/10 de millilitre d'une solution alcoolique d'orcinol à 10 p. 100.

On mélange, puis on porte au bain-marie bouillant pendant quarante-cinq minutes (dans chaque cas, un tube témoin contenait seulement les réactifs et de l'eau, sans ribose).

Les tubes étaient ensuite refroidis par un courant d'eau, puis leur contenu était examiné au moyen du photoabsorptiomètre de Meunier avec l'écran orangé. Des témoins étaient effectués avec du ribose.

Voici quelques résultats de nos essais. Dans tous les tableaux ci-joints, les résultats sont exprimés en microgrammes par millilitre. Dans chaque cas, les chiffres trouvés pour les essais à blanc étaient déduits.

Acide ribonucléique de levure purifiée par la méthode de Leitert Kurokawa [8].

Microgrammes d'acide ribonucléique.	10	20	30	40	50	60
Lectures photométriques	9	16	24	33	44	53
Microgrammes de ribose trouvés.	2,65	5,0	7,10	9,9	13,1	15,9
Ribose trouvé p. 100.	26,5	25,0	23,5	25,0	26,0	26,5

Or la teneur théorique en ribose de notre acide ribonucléique

était 54 p. 100 et nous n'en retrouvons en moyenne que 25,4 p. 100, soit moins de la moitié (47 p. 100).

MÉLANGE DE TÉTRANUCLÉOTIDES. — Un premier mélange de tétranucléotides fut préparé par hydrolyse alcaline partielle de l'acide ribonucléique étudié ci-dessus suivant la technique de Bredereck et Jochmann [5]. Les résultats furent remarquablement superposables à ceux obtenus pour l'acide ribonucléique non dépolymérisé. Nous pouvons donc conclure que l'erreur de la méthode de Mejbaum n'est pas le fait de l'état de polymérisation.

Microgrammes tétranucléotides . . .	10	20	30	40	50	60
Lectures photométriques	9	16	25	35	43	51
Microgrammes de ribose trouvés . . .	2,65	5,0	7,0	10,4	12,9	15,0
Ribose trouvé p. 100.	26,5	25,0	23,5	26	25,5	25,0

Un autre mélange de tétranucléotides obtenu en faisant agir de la ribonucléodépolymérase cristallisée sur de l'acide ribonucléique nous a donné des résultats superposables :

MONONUCLÉOTIDES. — Un mélange de mononucléotides dérivant du même acide ribonucléique fut préparé par hydrolyse partielle à froid au moyen d'ammoniaque concentrée suivant la technique de Calvery [6]. Les résultats furent encore remarquablement superposables à ceux obtenus pour l'acide ribonucléique lui-même :

Moyenne du ribose trouvé p. 100 de :

Acide ribonucléique	25,4	} L'écart quadratique moyen était dans chaque cas de 1,0.
Tétranucléotides	25,2	
Mononucléotides	25,4	

L'erreur de la méthode de Mejbaum ne provient donc en aucune façon de l'état de polymérisation des nucléotides.

MONONUCLÉOTIDES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES SÉPARÉS. — Nous avons préparé des mononucléotides et des nucléosides isolés, certains puriques, d'autres pyrimidiques ; les résultats obtenus en appliquant la méthode de Mejbaum à ces corps furent profondément dissemblables. Voici quelques exemples :

Guanosine (commerciale purifiée).

Microgrammes de guanosine	5	10	15	20	25	30
Lectures photométriques	8	17	23	33	39	49
Microgrammes de ribose trouvés . . .	2,3	5,0	6,8	9,9	11,5	14,5
Ribose trouvé p. 100.	46	50,0	45,5	49,0	46	48,5

La teneur théorique de la guanosine en ribose est 46,0 p. 100, or nous trouvons 47 avec un écart type de 2. Notre résultat est parfaitement acceptable.

**Acide cytidylique (préparé par la méthode de Brederéck [5]
en le séparant au moyen de pyridine).**

Microgrammes d'acide cytidylique . .	100	150	200	250	300
Lectures photométriques	6	7	11	12	14
Microgrammes de ribose trouvés . . .	1,8	2,0	3,2	3,9	4,3
Ribose trouvé p. 100	1,8	1,3	1,5	1,5	1,4

Au-dessous de 100 microgrammes par millilitre la lecture photométrique n'est pas significative, et pour les quantités plus grandes d'acide cytidylique les résultats sont absolument incompatibles avec le chiffre théorique de la teneur en ribose qui est 33 p. 100. Nous ne retrouvons donc par la méthode de Mejbaum, pour un nucléotide pyrimidique, qu'une fraction infime du ribose théorique (4,5 p. 100 environ). En se reportant à l'ancien travail de Hoffmann [3] on peut penser que ceci résulte de l'extrême lenteur de l'hydrolyse acide des nucléotides pyrimidiques. Mais une inconnue importante subsiste encore ici.

REMARQUE.

Pour extraire les acides nucléiques et les nucléotides des tissus étudiés, on utilise habituellement des épuisements à températures convenables par des solutions d'acide trichloracétique. Nous avons incidemment vérifié que, dans les conditions où l'on opère selon la technique de Schneider [7], l'acide trichloracétique ne modifie pas de façon appréciable les résultats obtenus par la méthode de dosage de Mejbaum. En effet, les résultats obtenus pour des solutions d'acide ribonucléique purifié en présence d'acide trichloracétique sont pratiquement les mêmes qu'en l'absence de cet acide.

RÉSUMÉ.

La méthode de microdosage colorimétrique du ribose dans les dérivés nucléiques qui fut proposée par Mejbaum et adaptée par Albaum et Umbreit ne donne pas des résultats exacts. Si on l'applique à un acide ribonucléique, on trouve une teneur en ribose qui n'est que la moitié environ du chiffre théorique.

Pour les mononucléotides et les nucléosides dont la base est purique, le résultat est bon, mais pour les composés dont la base est pyrimidique, on obtient un résultat qui ne correspond qu'à une très petite partie du ribose théorique. Ceci explique que dans

les acides nucléiques ainsi que dans les tétranucléotides ou dans les mélanges de mononucléotides qui en dérivent, on ne retrouve que 50 p. 100 environ du ribose.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MEJBAUM. *Zeitschr. Phys. Chem.*, 1939, **258**, 117.
- [2] ALBAUM et UMBREIT. *J. biol. Chem.*, 1947, **167**, 370.
- [3] HOFFMANN. *J. biol. Chem.*, 1927, **73**, 15.
- [4] GREGOIRE. *Actualités scient. et indust.*, 1945, **997**, 60.
- [5] BREDERECK et JOCHMANN. *Ber. Chem. Gesell.*, 1942, **75**, 395.
- [6] CALVERY (H. O.). *J. biol. Chem.*, 1927, **73**, 73.
- [7] SCHNEIDER. *J. biol. Chem.*, 1945, **161**, 293.
- [8] LEIFERT-KUROKAWA. *Bioch. Zeitschr.*, 1932, **246**, 1.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 3 Mars 1949.

Présidence de M. MAGROU.

II^e CONGRÈS INTERNATIONAL DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

Bruxelles, 21-23 mai 1949.

Le II^e Congrès de l'Association Internationale des Microbiologistes de Langue Française aura lieu à Bruxelles au mois de mai 1949. Il se déroulera en liaison avec le Symposium International des Anaérobies organisé sous l'égide de l'Union Internationale des Sciences Biologiques qui aura lieu du 23 au 25 mai. A cette occasion, l'Association des Microbiologistes de Langue Française a décidé de réserver la journée du 27 mai à des communications de langue française portant sur les anaérobies. Un programme détaillé sera envoyé à tous les membres. Le Secrétariat désire connaître dès à présent les participants éventuels au Congrès et les titres des communications que les auteurs désireraient présenter à cette occasion.

PROGRAMME PROVISOIRE

- I. M. Buchanan (Ames, Iowa) : Rôle des anaérobies en agronomie.
- II. M. Thaysen (Trinité) : Anaérobies fixateurs de l'azote. Comment conduire les investigations futures.
- III. M. Barker (Berkeley, Calif.) : Métabolisme des gaz chez les anaérobies.
- IV. M. Oakley (Welcome Institute) : Lécithinase, hyaluronidase et collagénase dans la série clostridienne tellurique.
- V. M. Meiklejohn (Rothampsted Harpenden) : Réduction des nitrates en nitrites en anaérobiose.
- VI. M. Jan Smit (Wagenigen) : Fermentations anaérobies naturelles.
- VII. M. Prévot (Paris) : Anaérobies réducteurs des sulfates et formation des pétroles.
- VIII. M. Pochon (Paris) : Anaérobies cellulolytiques.
- IX. M. Raynaud (Garches) : Anaérobies pectinolytiques.

X. M. Cohen (Garches) : Mécanisme de la fermentation acétobutyrique anaérobie.

XI. M. Senez (Marseille) : Anaérobies des sédiments marins.

Inscriptions : Secrétariat de la Société Française de Microbiologie, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris (XV^e).

NÉCROLOGIE

FÉLIX D'HÉRELLE

(1873-1949)

Il y a quelques jours un petit groupe de parents, d'amis et de pasteuriens assistait au départ vers un cimetière provincial de la dépouille du professeur Félix d'Hérelle, dont le nom restera attaché à la découverte et à l'étude d'un des phénomènes les plus étonnants de la microbiologie : celui de la lyse transmissible des microbes, causée par un agent spécifique, le bactériophage.

Félix d'Hérelle était Canadien. Il est né à Montréal le 25 avril 1873, d'un père descendant de ces colons français qui avaient suivi la trace de Jacques Cartier et d'une mère de souche hollandaise. Je l'imagine, enfant, jouant comme le font encore les petits Canadiens, à l'emplacement où s'éleva autrefois le village indien d'Hochelaga, sur les pentes de ce Mont-Royal que couronne aujourd'hui, comme un phare de la culture française au Nouveau Monde, une magnifique Université.

Mais le père de Félix d'Hérelle meurt alors que ce dernier est âgé de six ans, et sa mère vient chercher en France une vie moins rude. C'est là que d'Hérelle, après des études au Lycée Louis-le-Grand, commencera sa médecine qu'il ira achever en Hollande, à Leyde.

Jeune médecin, la recherche d'une situation et le goût des voyages vont l'orienter de façon inattendue vers la bactériologie. Il voit dans un journal qu'une place de chef de laboratoire est offerte à l'Hôpital général de Guatemala. Il se propose, est accepté, et c'est sur le bateau qui l'emmène en Amérique Centrale qu'il approfondit d'après les livres une branche de la médecine à laquelle il était resté jusque-là assez étranger.

A Guatemala City, il ajoute bientôt à ses fonctions de chef de laboratoire un enseignement à la Faculté de Médecine et se lance dans des recherches sur les fermentations.

C'est ainsi qu'il travaillera au Yucatan puis, à partir de 1907, à Mérida, au Mexique, pour étudier la fermentation de l'agave à sisal. En 1908, le Gouvernement mexicain l'envoie à Paris pour parfaire ses connaissances. Il prend alors contact avec l'Institut Pasteur et, séduit par l'atmosphère de travail qu'il y trouve, y entre en 1909 comme assistant dans le laboratoire de Salimbeni. Il ne quittera l'Institut Pasteur qu'en 1921 et poursuivra ses travaux d'abord dans le petit

pavillon qui est aujourd'hui le laboratoire de l'Hôpital, plus tard dans le service de Delzenne, dans le laboratoire de Pozerski, où celui-ci lui a offert un coin qu'il partagera fraternellement avec Eliava.

C'est à l'Institut Pasteur qu'il reprendra ses études, commencées au Yucatan, sur une entérite des acridiens due à un cocco-bacille spécifique. Et c'est à propos de ce germe qu'il observe pour la première fois dans les cultures sur gélose des taches curieuses qui apparaissent comme des trous sur la surface où se développe le microbe.

En 1915, la compétence qu'il a acquise dans les maladies des acridiens le fait envoyer par M. Roux en Tunisie pour étudier la lutte contre les sauterelles qui se signalent périodiquement par leurs déprédations.

Il retrouve chez ces insectes le même cocco-bacille, et sur les cultures observe à nouveau le même aspect étrange qu'il qualifie de « taches vierges ».

Sous l'influence des idées de Dorset, qui prédominaient alors depuis les recherches de cet auteur sur la peste porcine, il pense à un virus infectieux associé à un germe de sortie, et essaie d'isoler ce virus en filtrant les cultures en bouillon. Il constate ainsi qu'une goutte du filtrat ajoutée à des cultures ne présentant pas le phénomène des taches vierges fait apparaître ce dernier sur les milieux solides.

Dès cet instant, il pressent la découverte d'un phénomène d'une portée générale, qu'il associe à la lutte de l'organisme contre les maladies du tube digestif. L'occasion va lui être donnée presque immédiatement d'en apporter la démonstration. D'Hérelle est rentré à Paris : en 1916, une épidémie de dysenterie bacillaire sévit à Maisons-Laffitte, et dans les cultures de germes isolés à partir des déjections des malades d'Hérelle retrouve, une fois de plus, ce phénomène des taches vierges créant de singulières plages stériles sur la surface du milieu largement ensemencé.

Un malade hospitalisé à l'Hôpital de l'Institut Pasteur lui donne l'occasion d'étudier et de suivre le phénomène au cours de la maladie. Il a l'idée de le faire en ajoutant des filtrats de selles du malade à des cultures du bacille de Shiga. Il constate ainsi qu'au moment même où survient une amélioration de l'état du malade, il apparaît dans ses selles un principe filtrable qui, ajouté à une culture en bouillon du germe causal, la lyse complètement en quelques heures. Le phénomène peut être indéfiniment reproduit en reportant 1 goutte de la culture lysée dans une culture fraîche normalement développée. Et le 10 septembre 1917, M. Roux présente à l'Académie des Sciences une note de F. d'Hérelle intitulée : « Sur un microbe invisible antagoniste du bacille dysentérique ». Dans cette note concise où transparaît une géniale clarté, d'Hérelle décrit le phénomène et en expose l'étude, donne les méthodes d'isolement et celles de numération qui sont toujours en usage, propose les applications pratiques et discute le rôle éventuel joué dans l'immunité par le principe nouveau qu'il a observé. Il prend notamment position pour sa nature particulière, vivante, microbienne, et lui donne son nom : le bactériophage. Tout un chapitre nouveau de la microbiologie est en germe en ces deux pages.

En 1919, d'Hérelle reconnaît en France la typhose aviaire et, toujours par la même technique, isole les phages actifs contre le microbe. En

1920 il est envoyé par l'Institut Pasteur en Indochine ; il y étudie la dysenterie humaine et le barbone du buffle à propos duquel il perfectionne ses méthodes d'isolement des bactériophages. En 1921, il écrit son livre célèbre « *Le bactériophage et son comportement* », dont le retentissement est mondial. La même année, d'Hérelle quitte l'Institut Pasteur pour l'Université de Leyde, où il est nommé professeur extraordinaire. Il y reste deux ans. En 1923, il est nommé au Conseil Sanitaire et quarantenaire d'Egypte à Alexandrie. De là, en 1927, sur l'invitation de l'Indian Medical Service, il est envoyé étudier le choléra aux Indes, ce qui lui donne l'occasion de poursuivre ses recherches et de faire des essais de prophylaxie du choléra par le bactériophage aux Indes et en Assam. De 1928 à 1934, d'Hérelle est l'hôte de l'Université de Yale aux Etats-Unis : il y enseigne la protobiologie, néologisme désignant la science du bactériophage. En 1935, d'Hérelle est appelé par le Gouvernement de la République Socialiste de Géorgie à Tiflis où il organise un Institut d'étude du bactériophage. Il y trouve tout d'abord des conditions favorables à son travail et s'occupe des Instituts de Tiflis, Kiev et Kharkov. Mais les circonstances politiques évoluent à la suite de la mort d'Ordjonikidzé qui protégeait le savant ; son collaborateur et ancien camarade de l'Institut Pasteur, Eliava est arrêté et fusillé. D'Hérelle rentre en France et s'installe à Paris dans ce petit laboratoire de la rue Olivier-de-Serres qu'il ne quittera plus, sauf pour une résidence forcée à Vichy qui lui fut imposée en tant que Canadien par les Allemands pendant la durée de l'occupation.

C'est là que jusqu'à la fin, actif, infatigable, pétillant de vie malgré les ans, il ne cessera de travailler le bactériophage, poursuivant méthodiquement les idées d'application, notamment thérapeutiques, auxquelles il n'avait jamais renoncé.

Il y a quelques semaines, des troubles survenaient dans son état de santé et rendaient nécessaire une intervention. Malgré l'espoir du chirurgien, l'état de Félix d'Hérelle ne s'améliorait pas et le 22 février il a succombé entouré des siens.

Félix d'Hérelle était une curieuse et attachante personnalité. Vif, parfois irascible, il était un ami fidèle et sûr. S'il a parfois donné l'impression à ceux qui le connaissaient peu d'un caractère difficile, tous ceux qui l'ont approché n'ont cessé de vanter son humeur égale et affable, son ardeur joyeuse au travail.

D'Hérelle, qui avait la plus haute idée de l'importance de sa découverte, était resté le plus simple des hommes. Les honneurs qui lui étaient venus au cours de sa carrière, comme la médaille de Lœvenhœck en 1925 ou la médaille d'or de l'Asiatic Society qui lui fut donnée en 1930 pour ses travaux sur le choléra et de nombreux doctorats *honoris causa*, étaient accueillis par lui comme un juste hommage à ses travaux, mais dont l'homme ne tirait aucune vanité.

En octobre 1947, la Société Française de Microbiologie avait été heureuse d'accueillir d'Hérelle dans cet amphithéâtre pour fêter le trentième anniversaire de la découverte du bactériophage et lui remettre la médaille de l'Institut Pasteur. D'Hérelle n'avait pu cacher aux organisateurs de cette cérémonie, qui avait attiré une foule nombreuse, sa joie de se retrouver dans un Institut auquel il était demeuré sentimentalement et profondément attaché. Après que les orateurs eurent rendu hommage à la longue suite de travaux qui jalonnaient la route

ouverte par d'Hérelle depuis trente ans, le savant avait montré dans son allocution qu'il n'avait rien perdu de sa jeunesse, de sa vigueur ni de sa combativité. Et c'est avec une légitime fierté qu'il pouvait contempler non seulement l'œuvre accomplie par lui-même mais la masse des recherches que sa découverte avait inspirées.

D'un esprit essentiellement médical, d'Hérelle n'a cessé de rechercher dans le bactériophage des applications pratiques pour la lutte contre les maladies infectieuses ou leur thérapeutique. S'il ne demeura pas étranger aux controverses provoquées par le phénomène alors entièrement nouveau de la bactériolyse transmissible spécifique, ni aux problèmes philosophiques soulevés par le bactériophage, il était resté fidèle en dépit des développements récents aux conceptions qui avaient été celles de l'époque de ses principaux travaux.

Travailleur acharné, impétueux, d'Hérelle a été mu par un instinct génial beaucoup plus que par l'application de principes logiques. Presque toujours il a entrevu en un éclair, à partir des faits observés, les conséquences théoriques de son observation, puis expérimenté pour confirmer son intuition.

Quelle que soit l'évolution de nos idées présentes et futures sur la nature et le rôle du bactériophage on ne peut qu'être saisi d'admiration devant l'œuvre et la carrière de Félix d'Hérelle, et je suis sûr que la Société Française de Microbiologie s'associe unanimement à l'hommage que nous rendons, au nom de la microbiologie française, à l'auteur de la découverte du bactériophage.

Qu'il me soit permis, en exprimant nos condoléances à la famille de Félix d'Hérelle, d'y ajouter le témoignage de la gratitude de tous ceux qui, dans la Maison de Pasteur, se sont sentis, de près ou de loin, ses disciples.

Pierre LÉPINE.

COMMUNICATIONS

A PROPOS DE L'EXTRACTION DES CONSTITUANTS CELLULAIRES PAR LES ULTRASONS

par R.-O. PRUDHOMME et P. GRABAR.

On sait que les sons et U.S. (*) ont la propriété de désintégrer les cellules en suspension dans l'eau. Cette propriété a été utilisée par de nombreux chercheurs pour extraire les constituants cellulaires : diastases, antigènes, etc. (1, 2, 3).

(*) Lisez ultrasons. Nous utilisons dans nos expériences le générateur à quartz piezo-électrique de la Maison S.C.A.M., soit à la fréquence 960 Kc., soit à la fréquence 404 Kc.

(1) R. W. WOOD et A. L. LOOMIS, *Phil. Mag.*, 1927, 4, 417.

(2) A. CHAMBERS et F. W. FLOSDORF, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1936, 34, 631.

(3) P. GRABAR et M. ROUYER, *Ces Annales*, 1945, 71, 154.

Presque tous les auteurs pensent que la cavitation est à la base de ce phénomène. Il suffit en effet de la supprimer soit par surpression, soit en opérant, comme nous l'avons fait (4), dans un cylindre contenant la suspension dégazée pour que la suspension cellulaire reste intacte.

Cette désintégration a été expliquée (5) par l'action de l'onde de choc qui se produit au moment de l'affaissement des bulles de cavitation.

Cependant la cavitation a d'autres effets qui peuvent nuire à l'intégrité des composants ainsi extraits, notamment des phénomènes d'oxydation. Nous avons expliqué (6) le processus de ces oxydations : au moment de la formation de la bulle lenticulaire de cavitation, il y a accumulation de charges électriques de signes contraires sur les parois de la bulle. Il en résulte une décharge électrique à travers le gaz contenu dans cette bulle. Cette effluve provoque, d'une part, la luminescence que l'on observe dans l'eau pendant l'irradiation (7), d'autre part, une décomposition photochimique de l'eau avec libération de radicaux libres $-\text{OH}$. Ces derniers viennent se fixer sur les molécules en solution, si celles-ci sont des accepteurs.

On conçoit donc facilement que la désintégration par U.S. puisse s'accompagner de modifications profondes des constituants extraits. Par exemple, parmi les produits cellulaires il y a des protéides, et nous avons montré leur dénaturation (4) sous l'action de l'irradiation ultrasonore. De même, au moins certaines diastases sont facilement inactivées (8).

On pourrait éviter ces inconvénients si l'on trouvait un moyen d'empêcher les actions chimiques des U.S. tout en conservant leurs effets mécaniques. Nous avons étudié (6) l'action des différents gaz et vapeurs sur les actions chimiques des U.S., notamment sur des systèmes facilement oxydables : hydrate manganoux, sulfate ferreux, corps à doubles liaisons, etc.

Voici un bref résumé de nos résultats : a) En présence d'air, d'azote, d'argon, il y a oxydation ; b) en présence d'hydrogène, l'oxydation n'a pas lieu, sauf pour l'hydrate manganoux ; c) dans l'air, mais en présence d'une petite quantité d'un corps à haute tension de vapeur : éther, acétone, il n'y a pas non plus d'oxydation.

On a donc là deux moyens d'éviter les actions oxydantes des U.S. :

Soit opérer en présence d'hydrogène ;

Soit opérer en présence d'éther ou d'acétone.

Un troisième procédé peut consister en l'addition d'un réducteur ayant une affinité plus grande pour les radicaux $-\text{OH}$ que les corps que l'on veut extraire.

Il fallait s'assurer que la suppression des actions chimiques de la cavitation n'était pas accompagnée de la suppression des effets mécaniques. Nous l'avons vérifié par deux moyens : 1° l'action dépolymé-

(4) R.-O. PRUDHOMME et P. GRABAR, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29**, 122.

(5) M. ROUYER et P. GRABAR, *Ces Annales*, 1947, **73**, 215.

(6) R.-O. PRUDHOMME et P. GRABAR, *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 1821 et *J. Chim. Phys.* (sous presse).

(7) R.-O. PRUDHOMME, *J. Chim. Phys.* (sous presse).

(8) P. GRABAR, I. VOÏNOVITCH et R.-O. PRUDHOMME, *Biophys. Biochem. Act.* (sous presse).

risante des U.S. sur les hauts polymères n'est pas touchée si l'on opère en présence d'hydrogène ou d'éther (9) ; 2° une émulsion microbienne est aussi rapidement désintégrée en présence d'hydrogène ou d'un peu d'éther qu'en présence d'air. Cependant si la proportion d'éther est trop élevée il y a une légère diminution de la destruction microbienne.

On peut donc éviter l'oxydation des constituants cellulaires ou microbiens extraits par les U.S.

L'emploi de l'hydrogène est un procédé incommode nécessitant un dégazage presque parfait des suspensions. Les réducteurs peuvent ne pas toujours être efficaces si le corps extrait est plus oxydable que ceux-ci ; de plus, si l'extraction dure longtemps, il peut se faire que le réducteur soit entièrement oxydé et à ce moment les radicaux peuvent se porter sur un des corps que l'on cherche à obtenir.

Par contre, l'emploi de l'éther est un moyen simple d'éviter les actions chimiques des U.S. Il suffit d'en mettre 1 goutte pour 50 cm³ de la suspension à traiter.

En résumé, on peut éviter facilement l'oxydation des constituants cellulaires libérés par les U.S. en ajoutant à la suspension 1 goutte d'éther pour 50 cm³ de liquide à traiter.

(Institut Pasteur, Service de Chimie microbienne.)

INTÉRÊT DE LA TECHNIQUE CUTANÉE DANS LE DOSAGE COMPARÉ DES RICKETTSIES

par ROBERT VARGUES.

Le dosage de la virulence des rickettsies se pratique selon trois méthodes : 1° par inoculation intradermique dans la peau du lapin selon la technique de Giroud [1938] (1) ; 2° par injection des cultures dans la veine de la queue de la souris [technique de Gildemeister et Haagen, 1940] (2) ; ce procédé met en évidence l'effet toxique qui est étroitement associé aux corps rickettsiens vivants, comme l'ont souligné Bengston, Topping et Anderson en 1942 (3) ; 3° par titrage dans le poumon de souris en comptant le nombre des foyers constatés à la surface du poumon de la souris [Van den Ende et Mills, 1945] (4). De ces trois procédés, le premier apparaît extrêmement commode, car outre qu'il nécessite un nombre restreint d'animaux, il est applicable soit à la détermination de la virulence des cultures rickettsiennes, soit

(9) R.-O. PRUDHOMME et P. GRABAR, *Colloque des hauts polymères*, Strasbourg, janvier 1949 ; *J. Chim. Phys.* (sous presse).

(1) P. GIROUD, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 397 et 864.

(2) GILDEMEISTER et HAAGEN, *Deutsch. Med. Woch.*, 1940, **32**, 878.

(3) BENGSTON, TOPPING et ANDERSON, in *Studies of Typhus Fever*, U.S. Publ. Health Service, Washington, 1945.

(4) VAN DEN ENDE et MILLS, *Med. Res. Council Special Serie*, 1946, n° 255, 130.

à l'étude des anticorps neutralisants du sérum. Dans ces deux cas, des suspensions de rickettsies, différentes par la qualité des souches ou par la quantité de culture utilisée, en présence ou non d'anticorps neutralisants, sont effectuées *dans un même liquide*, puis inoculées au lapin. Les lésions intradermiques sont donc comparables, puisque seules varient la nature ou les propriétés des rickettsies, toutes choses restant constantes par ailleurs. On pouvait se demander si le liquide de suspension ne jouait pas un rôle dans la formation de la lésion locale, et si la technique permettait de juger comparativement de la conservation de la virulence des rickettsies mises en suspension *dans des liquides différents*. Nous avons eu à répondre par la négative à cette question dans une série d'essais entrepris au laboratoire dans un but tout différent ; il s'agissait pour nous de résoudre le problème pratique de la conservation des rickettsies par la dessiccation antibiotique.

Le résultat des expériences se rapportant au problème que nous traitons ici groupe trois séries d'essais, faits sur 18 lapins, utilisant trois souches de *Rickettsia prowazeki* (souches « HSP », « WXIII », « Alger »), ce qui correspond à plus de 200 dosages comparatifs.

Première série d'essais : La virulence des rickettsies est très sensible aux caractères physico-chimiques des liquides de suspension. — Nous avons choisi 12 liquides pour mettre en suspension les cultures rickettsiennes (culture sur poumon de souris) : a) Six liquides non organiques : eau distillée, eau physiologique à 0,85 p. 100, solution tampon Sorensen à pH 7,6, liquide de Tyrode, solution glucosée isotonique à 5 p. 100, solution glucosée à 30 p. 100 ; b) six liquides organiques : bouillon nutritif bactériologique, lait, albumine d'œuf à 10 p. 100 en eau distillée, jaune d'œuf à 10 p. 100 en eau distillée, sérum de lapin, sérum humain. 2 cm³ de chacun de ces 12 liquides sont ajoutés à 100 mg. d'un broyat de tissu pulmonaire très riche en rickettsies. Après mélange homogène par agitation, les suspensions obtenues sont laissées à la température ambiante pendant une demi-heure, puis titrées par inoculation dans le derme du lapin, à raison de 0,2 cm³ (soit 10 mg. de tissu) pour chaque injection ; chaque animal reçoit ainsi 12 injections sur la peau du dos et des flancs. Au quatrième jour, les lésions sont exprimées par la valeur du carré du rayon de la papule obtenue, multipliée par la hauteur de cette papule. Ces indices sont donnés dans la première ligne du tableau ci-joint, dans lequel nous avons résumé nos résultats en prenant les moyennes des chiffres notés pour les différents animaux inoculés avec le même produit. Nous rappelons que les indices volumétriques sont grossièrement fonction linéaire du logarithme de la concentration en matière virulente, pour des quantités allant de 0,1 à 50 mg. de tissu.

L'examen de la première ligne du tableau montre que le lait est, avec la suspension de jaune d'œuf et le bouillon nutritif, le meilleur liquide conservateur. Moins bons sont la solution tampon, le Tyrode, l'eau distillée et les sérums. Mauvais conservateurs enfin sont l'eau physiologique (pH 6,9), les solutions glucosées et l'albumine d'œuf, faits déjà établis en partie et que nous ne discuterons pas ici.

Signalons que nous avons fait des lapins témoins auxquels nous injectons seulement les liquides de suspension ; ces témoins ne font jamais de lésions visibles au quatrième jour.

	EAU DISTILLÉE	EAU PHYSIOLOGIQUE	SOLUTION TAMPON	TYRODE	GLUCOSE A 5 P. 400	GLUCOSE A 30 P. 100	BOUILLON	LAIT	SUSPENSION d'albumine d'œuf	SUSPENSION de jaune d'œuf	SÉRUM LAPIN	SÉRUM HUMAIN
1 ^{ers} essais :												
Avant dessiccation . . .	84	12	162	90	40	0	670	900	200	900	300	300
2 ^{es} essais :												
Après dessiccation et suspension en eau distillée.	24	0	90	24	20	0	468	500	42	500	150	170
3 ^{es} essais :												
Après dessiccation et suspension en lait	20	0	55	12	0	0	360	450	35	450	60	90

Deuxième série d'essais : La dessiccation anabiotique par lyophilisation ne modifie pas les différences de virulence constatées précédemment. — Afin de juger de l'hypothèse d'une action du liquide de suspension sur les lésions du lapin, nous avons desséché les différentes suspensions selon la technique de Flösdorf et Mudd (constante de dessiccation : congélation préalable des ampoules à -70° , vide de 1/10 de millimètre de Hg, paroi froide à -70° , durée de la dessiccation de deux heures et demie à trois heures). Après dessiccation les ampoules, scellées sous vide, sont conservées huit jours à $+20^{\circ}$, à l'obscurité. Au bout de ce temps le contrôle de virulence est pratiqué : le matériel de chaque ampoule est redissous avec 2 cm³ d'eau distillée. Les indices obtenus chez le lapin sont donnés à la deuxième ligne du tableau. Ils montrent qu'après dessiccation les mêmes différences de virulence et la même graduation du pouvoir conservateur sont observées. L'abaissement général des indices est attribuable à la technique de dessiccation, comme nous l'avons démontré antérieurement avec M. Giroud (5).

Troisième série d'essais : Le liquide de suspension n'a aucun effet sur les lésions cutanées du lapin. — Dans le deuxième essai, qui n'a d'autre intérêt que de servir de témoin, nous nous retrouvions dans des conditions analogues à celles de la première série d'expériences. Puisque le lait se montrait dans tous les cas, avant dessiccation comme après, le meilleur liquide de conservation, c'est au lait que nous nous sommes adressé afin de savoir si ce liquide avait par lui-même un pouvoir localisateur, exacerbant une virulence alors que d'autres liquides empêcheraient, par une diffusion plus rapide, la mise en évidence des réactions locales. Nous avons donc redissous le contenu desséché des ampoules dans 2 cm³ de lait. La troisième ligne du tableau donne les indices relevés au quatrième jour chez le lapin. Nous retrouvons des chiffres à peu près comparables à ceux de la deuxième expérience, compte tenu de la sensibilité particulière de chaque animal.

(5) GIROUD et VARGUES, *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 438.

Les trois souches utilisées se sont comportées de façon identique au cours de ces essais.

Les lésions intradermiques du lapin sont donc en relation avec la seule virulence du produit, c'est-à-dire avec sa capacité de se développer dans un organisme. Nous avons d'ailleurs contrôlé nos essais en pratiquant des cultures sur poumon de souris, en même temps que l'inoculation intradermique, avec le matériel qui nous a servi dans la deuxième série d'expériences : des cultures abondantes de rickettsies ont été obtenues avec les suspensions faites en bouillon, en jaune d'œuf, et en lait. Aucune culture avec les suspensions en solutions glucosées, en eau physiologique et en albumine d'œuf.

Conclusion. — 1° Par la méthode intradermique, nous avons étudié l'action de différents liquides de suspension sur la vitalité des rickettsies. Nous en avons déduit que, pour conserver les souches par la dessiccation anabiotique, il était convenable de mettre les cultures en suspension dans des liquides tels que le lait, le jaune d'œuf dilué ou le bouillon nutritif.

2° L'étude de ces faits nous a amené à affirmer une fois de plus l'intérêt de cette technique de dosage : le volume de la lésion locale produite dans le derme du lapin est uniquement fonction de la quantité de rickettsies virulentes existant dans le matériel inoculé, le liquide de suspension ne jouant aucun rôle, ni dans la détermination de la lésion, ni dans son intensité.

(Institut Pasteur. Service du Typhus.)

PROPRIÉTÉS SÉROLOGIQUES DES PHOSPHATIDES DU MUSCLE CARDIAQUE APRÈS HYDROGÉNATION

par M. FAURE.

Depuis que Pangborn (1) a isolé du muscle cardiaque un nouveau phosphatide : le « cardiolipide », on peut utiliser pour effectuer les diverses réactions sérologiques de la syphilis (2, 3, 4, 5, 6, etc.) des solutions « antigéniques » constituées par des mélanges en proportions déterminées de ce composé avec des lécithines et du cholestérol.

Ce « cardiolipide », qui est un acide phosphatique particulier, ne renferme que des acides gras non saturés (oléique et linoléique) tandis

(1) PANGBORN, *J. Bact.*, 1940, **39**, 80 ; 1945, **49**, 199 ; *J. biol. Chem.*, 1942, **143**, 247 ; 1944, **153**, 343 ; 1945, **157**, 691 ; 1945, **161**, 71 ; 1947, **168**, 351.

(2) MALTANER et MALTANER, *Ann. Rep. Div. labor. Res. N. Y. depart. Health*, 1943, 17.

(3) HARRIS et PORTNOY, *Vener. Dis. Inform.*, 1944, **25**, 353.

(4) BROWN, *J. Bact.*, 1944, **47**, 581.

(5) KLINE, *Am. J. clin. Pathol.*, 1946, **116**, 68.

(6) KAHN, Mc DERMOTT, MARCUS, WHEELER et BRANDON, *Univ. Hosp. Bull. Univ. Michigan*, 1946, **42**, 81.

que les lécithines contiennent des acides gras saturés et non saturés. Dans ce travail, nous avons cherché à connaître quelles modifications des propriétés sérologiques pouvait entraîner la transformation de la totalité des acides gras inclus dans ces molécules en acides gras saturés.

Nous avons utilisé des phosphatidates de sodium extraits du muscle cardiaque et purifiés selon une technique décrite antérieurement (7) [fraction n° 6. Indice d'iode : 125] et des lécithines provenant de la même matière première (indice d'iode : 69). Pour hydrogéner ces phosphatides, nous avons dissous les lécithines dans de l'acide acétique glacial et les phosphatidates, peu solubles dans ce solvant, dans un mélange de chloroforme et d'acide acétique glacial (1 : 1), puis, après addition d'une solution acétique d'acétate de palladium préparée selon la technique de Piccard et Thomas (8), nous avons fait barboter un courant d'hydrogène pendant quatre heures à la température du laboratoire. Nous avons obtenu des hydrolécithines et des « hydrophosphatidates » qui possèdent des indices d'iode nuls et des solubilités dans l'alcool beaucoup plus faibles que les substances initiales non saturées.

Pour étudier les propriétés sérologiques de ces produits, nous avons effectué des réactions de floculation et de fixation du complément : la micro-réaction de Brown (9) que l'on exécute sur une lame de verre comme la réaction de Kline et dont la suspension hapténique est préparée à partir d'une solution alcoolique contenant par centimètre cube : phosphatidates, 0,3 mg. ; lécithines, 3 mg. ; cholestérol, 9 mg. ; la réaction de Kolmer (10, 11) pour laquelle nous avons préparé la solution alcoolique hapténique en utilisant la formule 42 proposée par Harris et Portnoy (3) : phosphatidates, 0,6 mg. ; lécithines, 0,5 mg. ; cholestérol, 9 mg. par centimètre cube. Nous avons étudié parallèlement pour chacune de ces deux réactions l'association du cholestérol aux quatre combinaisons suivantes :

I : Phosphatidates.
Lécithines.

II : Hydrophosphatidates.
Lécithines.

III : Phosphatidates.
Hydrolécithines.

IV : Hydrophosphatidates.
Hydrolécithines.

Avec ces quatre types de préparations, on observe une floculation de la suspension de cholestérol et une fixation du complément en présence de sérums de sujets syphilitiques, tandis que ces réactions demeurent négatives en présence de sérums de sujets exempts de syphilis : ces phosphatides conservent donc leurs propriétés sérologiques après hydrogénation. On constate cependant que l'intensité des réactions n'est pas la même selon qu'on s'adresse à l'une ou à l'autre des quatre combinaisons envisagées plus haut et ceci tant pour les réactions de

(7) FAURE, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1948, **30**, 533.

(8) PICCARD et THOMAS, *Helv. Chim. Acta*, 1923, **6**, 1044.

(9) BROWN, *J. Immunol.*, 1946, **53**, 71.

(10) KOLMER et BOERNER, *Approved Laboratory Technic*, 1945.

(11) Nous avons effectué la fixation du complément à 37° pendant trente minutes et non à 6 à 8° pendant quinze à dix-huit heures comme le préconise cet auteur.

floculation (12) que pour les réactions de fixation du complément (13) ; on peut exprimer ces intensités par les chiffres arbitraires suivants :

Types de combinaisons	I	II	III	IV
Intensité des réactions	3,7	4	2	3

Ces différences quantitatives doivent être attribuées à des modifications des propriétés physico-chimiques des phosphatides après hydrogénation, propriétés qui jouent un rôle important dans la constitution des suspensions aqueuses hapténiques : modification de leur affinité pour l'eau d'une part, pour le cholestérol d'autre part, et modification aussi de l'affinité mutuelle des phosphatides pour les lécithines. On sait en effet que les savons saturés possèdent un pouvoir émulsionnant dans l'eau inférieur à celui de leurs homologues non saturés, que les longues chaînes carbonées donnent avec le cholestérol des complexes plus stables que les longues chaînes non saturées et enfin que les acides gras saturés ne s'associent que très faiblement avec les acides gras non saturés (14).

On voit donc que les acides gras qui entrent dans la constitution des phosphatides utilisés comme haptènes dans le séro-diagnostic de la syphilis ne jouent qu'un rôle secondaire qui se traduit seulement par des modifications de la « sensibilité » de ces réactions sérologiques. Ce fait explique, au moins partiellement (15), que des lécithines d'origines diverses : cœur, œuf, soja, pois, etc., qui diffèrent par la nature de leurs acides gras (15) ne présentent pas des propriétés identiques lorsqu'on les utilise dans la confection de ces suspensions hapténiques.

L'emploi « d'hydrophosphatides » présenterait l'avantage de donner des préparations moins labiles que les phosphatides qui sont très oxydables, mais la faible solubilité dans l'alcool des produits hydrogénés limite leur utilisation.

Conclusion. — Les phosphatides du muscle cardiaque conservent après hydrogénation leurs propriétés de fixation du complément et de floculation avec les sérums de sujets syphilitiques.

(Institut Pasteur.)

(12) Nous avons tout d'abord vérifié que, pour les quatre types de mélange, l'optimum de la sensibilité de la réaction de Brown est obtenu avec les proportions de phosphatides et de lécithines données plus haut : 0,3/3.

(13) La suspension hapténique préparée selon la formule IV pour la réaction de Kolmer présente un pouvoir anticomplémentaire supérieur à celui des autres suspensions, mais cette différence disparaît en présence d'un sérum normal.

(14) SCHULMANN et RIDEAL, *Proc. Roy. Soc. B*, 1937, **122**, 29.

(15) Ces préparations de lécithines diffèrent également par la nature et la quantité des impuretés qui les accompagnent en dépit de purifications répétées.

ETUDE CYTOLOGIQUE DE *PASTEURELLA PESTIS* SOUQUIS A L'INFLUENCE DU BACTÉRIOPHAGE SPÉCIFIQUE

I. — MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES DE L'APPAREIL NUCLÉAIRE

par H. S. P'AN, Y. T. TCHAN et J. POCHON.

Des travaux récents (1, 2, 3, 3 bis) ont montré d'une façon indéniable l'existence, dans le corps bactérien, d'un appareil nucléaire de nature désoxyribonucléique, alors que le protoplasme est de nature ribonucléique. Différentes méthodes d'hydrolyse acide [Feulgen, Robinow] (2), d'hydrolyse enzymatique [ribonucléase] (3), ou de coloration (3 bis) ont permis de mettre en évidence les caractères morphologiques et évolutifs du noyau.

Non seulement le mode d'évolution des divisions bactériennes normales peut être parfaitement suivi, mais aussi les différents aspects des perturbations cytologiques dues aux agents extérieurs.

Les modifications cytologiques des bactéries sous l'effet des antibiotiques comme la pénicilline et la streptomycine, des bactériostatiques de synthèse comme les sulfamidés, et des bactériolytiques comme les bactériophages, l'alexine, le lysozyme, ont été étudiées par Boivin, Tulasne, Vendrely, Levaditi, Henri, Smites, Welch, Elford, Beumer et Quersin (3, 4, 5, 6, 7, 8).

Poursuivant nos recherches sur *Pasteurella pestis*, nous apportons aujourd'hui des précisions sur les modifications morphologiques de ce germe attaqué par le bactériophage spécifique.

Tous nos essais sont faits avec une culture jeune de quatre heures (provenant d'une culture de vingt-quatre heures) où les bactéries sont plus volumineuses et plus faciles à examiner.

Technique. — Le milieu de gélose nutritive est coulé dans deux boîtes de Petri, l'émulsion microbienne est uniformément répartie sur la surface de la gélose, on laisse dans l'étuve à 34° pendant quatre heures : puis sur l'une des deux boîtes on verse III à IV gouttes de bactériophage pour couvrir d'une façon aussi homogène que possible toute la surface de la culture. L'autre boîte sert de témoin, sans bactério-

(1) G. KNAYS, *Element of Bacterial Cytology*, N. Y., 1944.

(2) DUBOS, *The Bacterial Cell*, 1946.

(3) BOIVIN, VENDRELY et TULASNE, *Arch. Scien. Physiol.*, 1947, 3, 307.

(3 bis) PIECHAUD, ces *Annales*,

(4) BOIVIN, TULASNE, VENDRELY et MINCK, *Bull. Acad. Méd.*, 1948, 132, 37.

(5) C. LEVADITI et J. HENRY, *Rev. Immunol.*, 1948, 12, 193.

(6) J. SMITES, F. V. WELCH et W. J. ELFORD, *Journ. gen. Microb.*, 1948, 2, 220.

(7) J. BEUMER et L. QUERSIN, *C. R. Soc Biol.*, 1947, 141, 1280.

(8) L. QUERSIN, ces *Annales*, 1948, 75, 522.

phage. Après une heure de contact, toutes les trente minutes, on détache un petit carré de gélose et on impressionne la face où il y a culture sur une lame propre, puis on enlève brusquement ce carré de gélose. Ces lames ainsi préparées sont traitées simultanément avec la technique de Robinow et avec la technique à la ribonucléase : ces deux méthodes nous paraissent donner les meilleurs résultats ; ils sont superposables dans les deux cas. Les témoins sont constitués par des

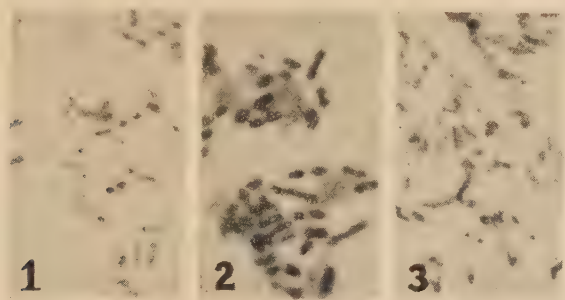


FIG. 1. — Témoin. Culture de *Pasteurella pestis* sans bactériophage.

FIG. 2. — Début de modification nucléaire due à l'attaque du bactériophage : gonflement et fusion des grains chromatiques.

FIG. 3. — Modification nucléaire au stade terminal de l'attaque du bactériophage : transformation en filament suivi d'amincissement et désagrégation.



Fig. 4

FIG. 4. — Différents stades de modifications cytotologiques de *Pasteurella pestis* au cours de l'attaque du bactériophage.

préparations sans bactériophage avec hydrolyse ou non, et des préparations avec bactériophage sans hydrolyse.

En effet, nos préparations témoins (sans bactériophage, mais avec hydrolyse) nous permettent de suivre l'évolution normale de la division bactérienne, décrite dans notre précédente communication (9), caractérisée par : réunion des deux grains chromatiques du début en haltère, suivie de division en quatre grains liés entre eux par de fins filaments, enfin étranglement et séparation des corps cellulaires donnant alors deux cellules-filles avec chacune deux grains.

(9) WEI, TCHAN et POCHON, *Ces Annales*, 1948, 75, 87.

Au contraire, sur des préparations avec bactériophage et hydrolyse, nous avons pu constater, dès les premières heures, des troubles dans l'évolution du développement bactérien. Tout au début, les corps bactériens et leur appareil nucléaire augmentent de volume. Les grains chromatiques, au lieu d'évoluer vers la scission et de présenter des formes normales de division, se gonflent, fusionnent davantage, donnent ainsi un aspect linéaire avec des renflements. Au fur et à mesure que le corps bactérien s'agrandit, l'appareil nucléaire s'allonge, s'étire, ayant ensuite un aspect de filament plus ou moins grêle, de longueur variable. On peut observer encore des formes sinueuses ou spirales. A un stade plus avancé, le développement du corps bactérien s'arrête et la partie protoplasmique commence à être attaquée, le contour bactérien paraît moins net et déchiqueté. Vers la quatrième-cinquième heure la forme filamenteuse du noyau se rétrécit, devient plus mince ; sa colorabilité diminue et, finalement, on ne peut guère la distinguer du reste du protoplasme qui est, lui aussi, fortement altéré. Souvent, sur la même préparation, on peut apercevoir les différents degrés de modifications dues à l'attaque du bactériophage.

Cette attaque importante de l'appareil nucléaire par le bactériophage nous paraît différente de la perturbation cytologique provoquée par les antibiotiques (4, 5) qui, au contraire, inhibent plus la division protoplasmique que la division nucléaire. Les noyaux bactériens traités par la pénicilline étant plus fréquemment en figure de division que dans le témoin, les germes continuent à s'allonger avec multiplication active du nombre de leurs noyaux, mais sans scission protoplasmique concomitante, amenant ainsi une forme longue de taille extraordinaire.

Dans nos essais avec *Pasteurella pestis*, étant donné la possibilité du polymorphisme des cultures, nous avons effectué celles-ci à différentes températures. Nous avons pu obtenir, avec la culture sans bactériophage, des formes très longues en chaînettes avec noyaux en chapelet ; quelquefois ces noyaux s'unissent, mais ils n'ont jamais présenté les aspects successifs de fusion des noyaux, formation du filament suivie d'amincissement et de désagrégation. Nous n'avons jamais vu, avec la culture en présence du bactériophage, les formes anormales, montrant l'hyperfonctionnement du noyau cellulaire avec l'arrêt de la division protoplasmique.

Il semble que, avant la lyse complète de la cellule, il y ait une série de modifications successives de l'aspect nucléaire, caractérisées par : gonflement et fusion des noyaux, transformation en filament suivi d'amincissement et de désagrégation.

Avec *Pasteurella pestis*, nous confirmons les observations de Beumer et Quersin sur le bacille de Shiga (7, 8) tout en apportant des précisions sur le mode d'évolution nucléaire. L'hypothèse de l'augmentation de l'acide désoxyribonucléique due à un apport supplémentaire par le bactériophage ne peut, à notre avis, être résolue que par des examens au microscope électronique. Cependant l'hypothèse d'un blocage de certaines fonctions normales des bactéries, selon un mécanisme analogue à celui des antibiotiques, provoquant l'amincissement et la désagrégation du noyau, n'est pas à abandonner.

(Institut Pasteur, Service Microbie Technique.)

INTÉRÊT DE L'OBSERVATION PAR CONTRASTE DE PHASE POUR LA MICROMANIPULATION

par P. MANIGAULT et Y. T. TCHAN.

Depuis plusieurs années l'observation par contraste de phase retient l'attention des usagers du microscope, mais bien peu d'entre nous ont eu le privilège de se servir de ces objectifs spéciaux, trop rares en France où on ne les fabrique pas encore. Pourtant, en employant un objectif faible, dont le plan focal arrière est accessible parce qu'il est situé derrière la dernière lentille, on peut réaliser à peu de frais le montage de Kastler et Montarnal qui a été déjà décrit ici, ou même celui de Locquin (1). Il suffit de disposer de deux lames de cellophane d'épaisseur convenable et d'un dispositif d'observation en lumière polarisée, par exemple les deux polaroïds. Avec le concours de M. Yeouta nous avons pu essayer plusieurs objectifs de grossissement propre 10 à 40, en contraste positif et négatif, avec réglage de la phase et de l'amplitude. Les figures ci-jointes montrent que s'il n'est pas possible de distinguer la structure des germes, leur image offre un contraste tel que leur micromanipulation est grandement facilitée (fig. 1, p. 472).

(Institut Pasteur.)

LA PHOTOMICROGRAPHIE SUR FILM INVERSIBLE DE 16 MILLIMÈTRES

par FERNAND OBATON.

L'enregistrement photographique est le complément logique de l'observation au microscope. La photomicrographie est l'une des branches de la photographie qui est devenue l'auxiliaire de la recherche scientifique.

Mais la photographie est elle-même une science en évolution constante et il est nécessaire, de temps à autre, de mettre ses progrès à la disposition des autres techniques scientifiques. En 1945, le Centre National de la Recherche Scientifique m'a chargé d'étudier un appareillage photographique spécialement adapté aux conditions du travail dans les sciences biologiques. Les recherches entreprises ont abouti à la construction d'un matériel établi pour mettre en œuvre une méthode pho-

(1) DE GRAMONT, *Microscopie*, 1948, 4, 62. — KASTLER et MONTARNAL, *Nature*, 1948, 161, 357. — MONTARNAL, *Revue d'Optique*, 1948, 27, 477. — LOCQUIN, *Microscopie*, 1948, 4, 47.

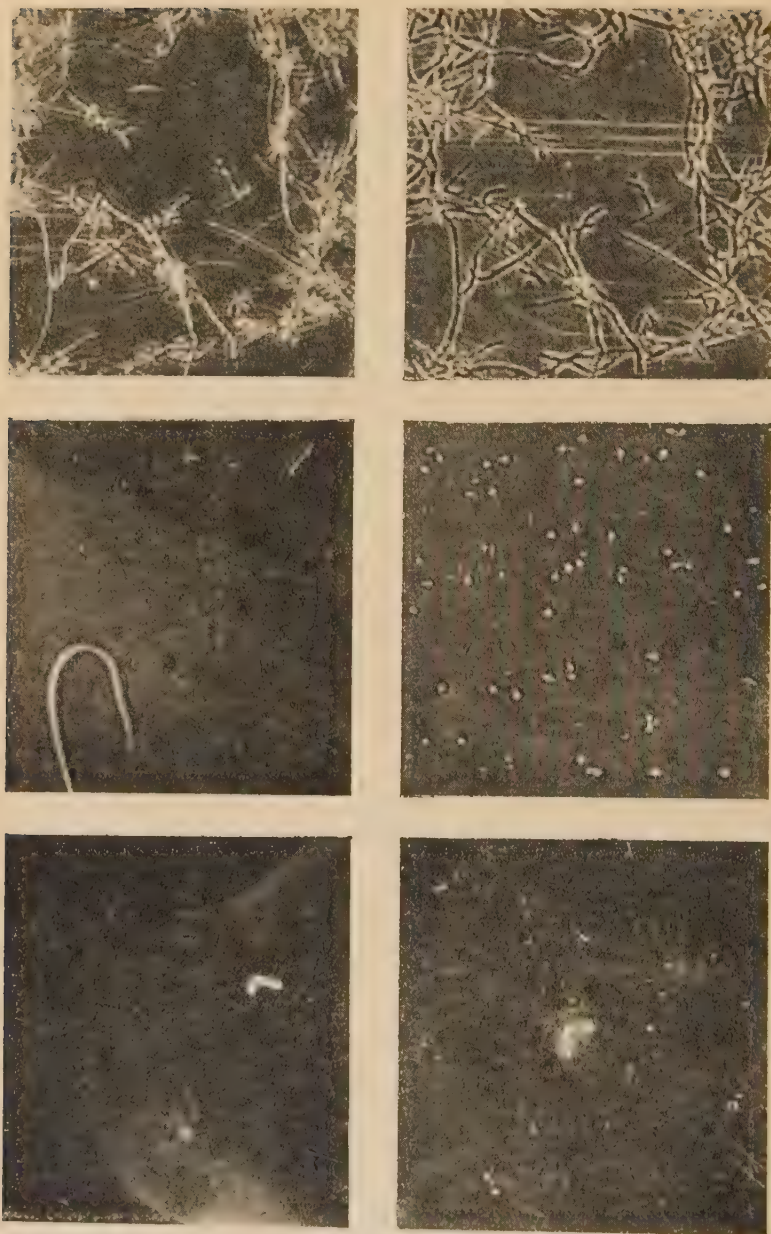


FIG. 1. — Intérêt de l'observation par contraste de phase pour la micromanipulation : ocul. $42\times$; obj., $40\times$. En haut : à gauche, contraste positif, bacille du charbon; à droite, contraste négatif, bacille du charbon. Au milieu : à gauche, anse de micromanipulation et cellule de levure; à droite, culture de staphylocoque. En bas, à gauche, cellule de levure isolée dans une goutte d'eau; à droite, autre cellule de levure isolée.

tographique nouvelle : l'utilisation du film inversible 16 mm. Une première communication a été faite à la Société Française de Photographie et de Cinématographie en 1942. Les études théoriques sont maintenant terminées, la méthode donne de bons résultats, tous les buts proposés sont atteints. Pour que les usagers puissent profiter du travail effectué il y a lieu d'envisager la phase des réalisations pratiques. Les laboratoires pourront ainsi bénéficier d'une technique moderne qui, en dehors des avantages matériels qui justifient son étude, a l'avantage moral de ne rien devoir aux conceptions étrangères.

Le but de cette note n'est pas de développer les principes de la méthode préconisée, mais de montrer qu'elle s'applique également à la photomicrographie. La démonstration faite en séance a permis de se rendre compte des avantages qu'elle comporte. Autrefois on faisait des photomicrographies sur plaques 9/12 cm. Les Allemands ont proposé d'opérer sur film cinématographique de 35 mm. Nous allons voir qu'il y a intérêt à utiliser le film cinématographique de format réduit 16 mm.

L'appareil de photomicrographie sur plaques 9/12 était encombrant. Il exigeait pratiquement un local distinct du laboratoire. Les appareils à film de 35 mm. étaient beaucoup plus maniables et l'enregistrement d'un cliché n'obligeait pas à faire des préparatifs spéciaux. Il pouvait être effectué commodément au cours de l'observation, à la condition d'immobiliser l'appareil photographique pour cet usage. L'idéal, en photographie, est toujours de voir l'image telle qu'elle sera enregistrée. Le 9/12 avait cet avantage, au prix de quelques contorsions de l'opérateur. Les dispositifs à film de 35 mm. sont d'un emploi très pratique mais la visée s'effectue uniquement sur l'image aérienne qui est toujours trop flatteuse et l'image photographique correspond rarement à la qualité de la visée, en raison du pouvoir d'accommodation de l'œil. Dans le dispositif présenté on a à la fois la vue totale sur un verre doux et au centre la visée de l'image aérienne sur une petite partie de la surface. Cette visée est rendue précise par l'emploi d'une loupe grossissant dix ou vingt fois en diamètre. Un point a été complètement négligé jusqu'ici en photomicrographie, c'est la mesure du temps de pose. On sait qu'une image n'est correcte qu'à la condition d'avoir reçu une quantité de lumière suffisante. Dans notre appareil on remplace la loupe et le verre doux du viseur par une cellule photo-émissive reliée à un galvanomètre dont les déviations indiquent l'intensité d'éclairement de l'image. On peut donc régler le temps de pose ou inversement fixer le temps de pose et ajuster la valeur de l'éclairement. Le magasin peut être chargé avec l'un des quatre types d'émulsions qui existent sur film 16 mm. : négative, positive pour clichés à grands contrastes, couleur, inversible. Cette dernière émulsion est la plus intéressante lorsqu'il s'agit d'obtenir rapidement des clichés de projection : elle n'existe pas dans le format 35 mm. et il est probable que les fabricants ne s'intéresseront jamais à sa préparation car elle n'a pas d'emploi pour le cinéma professionnel. Grâce à cette émulsion on peut projeter une série d'une vingtaine de clichés une heure après les avoir enregistrés. Jusqu'à présent, avec les appareils modernes de petit format, l'opérateur était tenu d'utiliser l'émulsion contenue dans le magasin jusqu'à épuisement de celui-ci. Cette obligation correspond à un acte de despotisme du constructeur vis-à-vis des usagers. Autrefois,

lorsqu'on utilisait des plaques, on avait le choix entre les émulsions contenues dans les châssis. Il paraît indispensable de rétablir ces conditions en munissant les appareils de magasins interchangeables. C'est ce qui a été réalisé dans notre appareil de photomicrographie.

En résumé le matériel comporte les parties suivantes : une attache micro de Leitz et une allonge qui remplace l'appareil Leica. Sur la plateforme de ce tube on place une chambre comportant un verre doux dont le centre est rendu transparent et une forte loupe réglable. A cette chambre on peut substituer une cellule photo-émissive reliée à un galvanomètre ou un magasin renfermant deux bobines de film, un presseur, un entraîneur et un volet de fermeture. Le dos de ce magasin est recouvert d'une plaque de rhodoïd blanc sur laquelle on peut inscrire les vues enregistrées. Les opérations se résument en une mise en place de l'image qui est forcément exacte et correcte comme mise au point, une mesure de la lumière et l'enregistrement de l'image. Le développement, l'inversion, le séchage et le montage des vues seront décrits dans les mémoires de la Société Française de Microscopie théorique et appliquée.

La démonstration faite en séance comportait la photographie sur film inversible de quelques préparations. Les clichés ont été projetés cinquante-cinq minutes après la fin de l'enregistrement. Pour montrer que le format 10/15 mm. que j'ai appelé le format « Micron » convient particulièrement bien aux recherches de Biologie, cette présentation a été complétée par la projection d'un certain nombre de clichés pris dans les conditions les plus variées. L'appareil construit permet en effet de photographier, sans accessoires, tous les objets ou les documents depuis la distance de 10 cm. jusqu'à l'infini. C'est ainsi que l'écran a montré de petits *Lycoperdon* de quelques millimètres de diamètre cachés dans la mousse, des feuilles de *Rubus* jaunes parsemées de points rouges correspondant au développement de l'anthocyane à l'endroit d'une piqûre d'insecte, les différentes teintes prises par une route en forêt au cours du jaunissement autumnal, des corymbes de cerises dont le relief saisissant est dû à la grande profondeur de champ de l'objectif à courte longueur focale. Mais si l'émulsion Kodachrome donne la facilité d'aborder ces sujets, le film inversible noir a également un grand intérêt. Nous avons présenté des photomicrographies de diatomées qui ont pu être résolues, ce qui montre les limites des possibilités du film inversible 16 mm. Des photographies sur papier tirées par agrandissement à 8 ou 10 diamètres à partir de négatifs rendent utilisables les documents pour l'illustration d'articles scientifiques.

(Collège de France, Station Berthelot, Bellevue.)

NOTICE SUR LES HUILES D'IMMERSION POUR MICROSCOPIE

par PAUL DEMONT.

L'utilisation des objectifs forts à immersion exige l'emploi d'un liquide intercalaire possédant un indice de réfraction suffisant pour concentrer les rayons lumineux. L'application de l'huile de cèdre d'indice $n=1,515$ presque identique à celui du verre a permis de réaliser ce que l'on a désigné sous le nom d'immersion homogène.

De nombreux microscopistes ont constaté la difficulté qu'il y a à trouver régulièrement une huile de cèdre convenable, même en s'adressant au fabricant de l'objectif. Ce fait s'est particulièrement révélé durant la période de guerre et même actuellement les huiles de cèdre fournies sont de qualité inférieure. L'huile de cèdre possède en outre un inconvénient majeur, celui de poisser et d'adhérer fortement en se résinifiant si, par oubli, on la laisse sécher sur la lentille frontale d'un objectif ou sur une préparation.

Quelques microscopistes ont cherché cependant à tourner ces difficultés en proposant d'autres huiles d'immersion. On a recouru tout d'abord au benzoate de méthyle, d'indice $n = 1,517$ très favorable, et qui possède en outre la propriété de se volatiliser sans laisser de traces, mais à mon point de vue, trop fluide. Rowntree a proposé ensuite l'huile de paraffine d'indice $n = 1,47$, qui ne donne pas une définition très bonne et qui est de luminosité plus faible. Jensen a toutefois considérablement amélioré l'emploi de l'huile de paraffine en l'additionnant de bromonaphtaline d'indice $n = 1,656$. Les proportions à mélanger recommandées par Jensen sont de 24 parties de bromonaphtaline pour 76 parties d'huile de paraffine. On peut même avec les huiles très transparentes comme l'huile américaine Nujol ne mélanger que 12 à 14 parties de bromonaphtaline. Nous-même avons fait quelques essais de différents mélanges de bromonaphtaline-huile de paraffine, mais les avons finalement abandonnés, car comme le benzoate de méthyle, ils sont trop fluides, coulent facilement et se répandent non seulement sur la préparation mais encore sur la platine, pour peu qu'on travaille avec le microscope en position inclinée.

Laissant de côté le mélange glycérine-eau proposé par Courtade qui ne peut fournir un indice favorable puisque la glycérine pure et seule employée possède tout au plus l'indice $n = 1,47$, l'eau n'ayant que 1,33, nous n'avons pas même songé au mélange huile de résine blonde-huile de lin proposé par Calvet et Morato pour nous rabattre sur l'indication fournie par Joyeux, disant qu'on peut obtenir des résultats suffisants avec l'huile de ricin officinale, d'indice $n = 1,48$. Nous avons alors cherché à améliorer cette dernière en la mélangeant à des liquides parfaitement miscibles et d'indice de réfraction supérieur. Le benzoate de benzyle avec son indice $n = 1,57$ s'est révélé le liquide de choix. Après calcul et essais, nous avons retenu le mélange suivant qui nous a donné entière satisfaction :

Huile de ricin officinale.	($n = 1,48$)	70 g.
Benzoate de benzyle pur	($n = 1,57$)	30 g.

Pour obtenir un mélange parfait des deux produits, il faut procéder comme suit : Peser les ingrédients dans un flacon de verre à bouchon rodé d'une capacité en centimètres cubes double du poids total en grammes des ingrédients que l'on veut mélanger. Agiter violemment le flacon durant une dizaine de minutes puis le laisser reposer à l'étuve à 37° durant cinq à six heures. Agiter à nouveau violemment le flacon durant cinq minutes et le laisser reposer ensuite durant la nuit à la température du laboratoire. L'huile d'immersion est alors prête à l'emploi. Elle présente un indice très voisin de $n = 1,51$. Cette huile ne modifie jamais les couleurs, ne poisse pas, s'enlève facilement de l'objectif ou d'une préparation au moyen d'un morceau de papier de soie, possède un degré de fluidité qui l'empêche de couler en position inclinée du microscope et s'étend facilement sur la préparation lorsqu'on examine cette dernière et qu'on la manœuvre à la main ou avec la platine mobile. Comme on peut s'en rendre compte par les prix de l'huile de ricin officinale et du benzoate de benzyle, cette huile est peu coûteuse.

Nous nous servons encore actuellement comme huile d'immersion d'un tel mélange préparé en 1943 et qui n'a perdu aucune de ses qualités, bien qu'il soit conservé en flacon blanc à fermeture rodée. Le verre de couleur est donc superflu.

(Station laitière de Grangeneuve-Fribourg.)

SUR UNE NOUVELLE BACTÉRIE ANAÉROBIE :

RISTELLA PSEUDO-INSOLITA nov. sp.

par H. BEERENS et N. ALADAME.

En 1933, Eggerth et Gagnon ont décrit sommairement sous le nom de *Bacteroides insolitus* une espèce anaérobie de l'intestin de l'homme qui, à cette époque, paraissait très rare puisque cette description était fondée sur l'étude d'une souche unique (1). En 1938, A.-R. Prévot a rattaché cette espèce au genre *Ristella*, dont elle a tous les caractères génériques (2). A partir de cette époque, elle fut retrouvée huit fois par le Service des Anaérobies de l'Institut Pasteur de Paris (3 souches dans l'appendicite aiguë, 1 souche dans un abcès du poumon et 4 souches dans les selles du nourrisson normal) et une fois à l'Institut Pasteur de Lille (péritonite). Il s'agit donc d'une espèce assez fréquente et l'étude des souches ainsi isolées a permis à A.-R. Prévot et ses collaborateurs (3) d'en compléter l'étude : caractères morphologiques et

(1) EGGERTH et GAGNON, 1933, cités par WEINBERG, NATIVELLE et PRÉVOT, *Les microbes anaérobies*, 1 vol., Masson, édit., 782.

(2) A.-R. PRÉVOT, *Ces Annales*, 1938, **60**, 285.

(3) A.-R. PRÉVOT, M. DIGEON, M. PEYRÉ, M. PANTALÉON et J. SENEZ, *Ces Annales*, 1947, **73**, 409.

physiologiques, en particulier biochimiques, de sorte que sa description complète figure à sa place naturelle parmi les espèces du genre *Ristella* (4).

Or, depuis 1925, 4 souches assez voisines de *Ristella insolita* ont été isolées et étudiées par les Services des Anaérobies des Instituts Pasteur de Paris et de Lille sans pouvoir être identifiées à ladite espèce ni à aucune autre espèce connue.

Les trois premières de ces souches : n° 155, n° 168 et n° 184 provenaient de cas d'appendicite aiguë. Elles ont été entretenues jusqu'en 1940 sous l'étiquette « Souches indéterminées, voisines de *R. insolita* », sont mortes pendant l'exode de 1940 ; leur fiche descriptive a été gardée. La quatrième a été isolée par H. Beerens, d'un pus d'abcès de la fosse iliaque et d'un pus d'abcès sous-hépatique consécutifs à une appendicite aiguë chez un enfant de treize ans. La flore microbienne associée à cette bactérie était très abondante et comportait en aérobie : *Escherichia coli* et *Streptococcus* ; en anaérobiose : *Fusiformis fusiformis*, *Fusiformis biacutus*, *Streptococcus micros*. Elle porte le n° 376 de la collection des Bactéries anaérobies du Dr Prévot et son étude a été parachevée. Ces 4 souches sont semblables entre elles et diffèrent de *R. insolita*. En voici la description :

Habitat : Intestin humain.

Morphologie : Bâtonnet droit ou légèrement infléchi, de $1,5 \mu \times 0,6 \mu$, à extrémités arrondies, isolé ou en petits amas informes, asporulé, immobile, acilié, Gram-négatif.

Physiologie : Anaérobie strict. Température optimum 37° . Thermorésistance nulle ; longévité supérieure à quinze jours en tubes scellés pouvant atteindre plusieurs années par repiquage. Réducteur (phénosafranine et rouge-neutre réduits).

Cultures : Gazogènes et légèrement fétides.

Gélose profonde : Colonies punctiformes. Peu de gaz.

Eau peptonée : Trouble abondant en vingt-quatre heures. Gaz.

Bouillon VF glucosé : Trouble très abondant en vingt-quatre heures. Gaz.

Gélatine : Trouble abondant. Non liquéfiée.

Lait : Coagulé en vingt-quatre heures, avec légère rétraction du caillot.

Sérum coagulé, blanc d'œuf coagulé, fibrine, cervelle : Non digérés.

Glucides : Glucose, lévulose, maltose, galactose, saccharose et lactose fortement fermentés.

Nitrites : Non réduits en nitrites.

Caractères biochimiques : Il ne produit ni indol, ni scatol, ni acétone, ni alcool, ni crésol, ni phénol. Produit NH_3 , SH_2 (grande quantité), amines volatiles, cétones, acides acétique, butyrique et lactique.

Pouvoir pathogène : Sa présence en association dans l'appendicite aiguë ne suffit pas à prouver son pouvoir pathogène spontané. L'injection de culture pure aux animaux de laboratoire n'a donné aucun résultat. Mais ceci ne suffit pas non plus à lui dénier tout pouvoir pathogène. Le fait que nos 4 souches ont été isolées de l'appendicite aiguë milite en faveur d'un certain pouvoir pathogène par association,

(4) A.-R. PRÉVOT, *Manuel de Classification des Anaérobies*, 2^e édit., 1948, 80.

comme tant de germes de la flore anaérobie endogène. Sa fétidité, en tout cas, imprime le caractère putride aux processus infectieux où elle se trouve mêlée. Pas de toxine ni d'hémolysine.

Position dans la systématique : Il s'agit sans conteste d'une espèce du genre *Ristella*. Parmi ces espèces elle ressemble beaucoup à *R. insolita*, avec laquelle elle a de nombreux caractères communs. Elle s'en distingue toutefois par trois caractères importants : absence d'indol, type fermentaire différent (acéto-butyrique au lieu de formo-propionique) et fétidité. Nous la considérons donc comme une espèce nouvelle et proposons pour elle le nom de *Ristella pseudo-insolita*.

(Services des Anaérobies des Instituts Pasteur de Lille et de Paris.)

SUR UNE NOUVELLE ACTINOMYCÉTALE ANAÉROBIE DES CELLULITES JUGALES :

ACTINOBACTERIUM CELLULITIS n. sp.

par J. LINHARD.

Nous avons isolé du pus à polynucléaires d'une cellulite jugale d'origine dentaire probable et d'allure clinique actinomycotique, chez un homme de vingt-sept ans (1), associée à *Staphylococcus anaerobius*, à des fusiformes et à de rares spirochètes (2), une souche d'Actinomycétale anaérobie répondant à une espèce nouvelle dont voici la description :

Habitat : Vraisemblablement cavité buccale de l'homme.

Morphologie : Bâtonnet très polymorphe, présentant des ramifications primaires, secondaires et parfois tertiaires, avec renflements en massues des extrémités. L'élément isolé mesure 5 à 7 μ de long sur 0,6 μ de large, les massues atteignant 1,2 μ à 1,8 μ de large. Immobile, acilié, asporulé, Gram-positif.

Physiologie : Anaérobie micro-aérophile dont la zone de fertilité maximum dans la gélose profonde se trouve à 4 à 5 mm. de la surface. Sérophile au début, il s'adapte aux milieux sans sérum où on l'entretient très facilement. Sa longévité dépasse cinq semaines. Il résiste une minute à 60° C. Il ne réduit ni le rouge neutre, ni la safranine, ni la phéno-safranine.

Cultures : Gazogènes, mais non fétides.

En gélose profonde les colonies sont lenticulaires, trapues, du type cunéiforme. Pas de gaz. En eau peptonée, culture grumeleuse peu abondante ne troublant pas le milieu. En bouillon V. F. glucosé, absence de trouble mais culture abondante en grumeaux volumineux se déposant rapidement. Quand on imprime au tube de petits chocs

(1) Ce malade nous a été adressé par le Dr LATTES, stomatologiste des Hôpitaux, que nous remercions très vivement.

(2) Ce pus a été ensemencé en même temps sur gélose Sabouraud en aérobiose pour la recherche des Actinomycètes aérobies, et cette recherche est restée négative.

répétés, il se dégage un peu de gaz. La gélatine n'est pas liquéfiée le lait ne subit aucune modification. Les protéines coagulées ne sont pas attaquées.

Parmi les glucides, seuls sont fermentés : glucose, lévulose, maltose, galactose et saccharose.

Caractères biochimiques : Les nitrates sont réduits en nitrites en cinq jours en présence d'eau peptonée additionnée d'un des glucides suivants : lévulose, maltose, galactose. La fermentation du bouillon glucosé produit NH_3 (0,034 g. pour 100 cm^3), des amines volatiles, des aldéhydes, des cétones. L'acidité volatile totale est de 0,292 g. par litre. C'est un mélange à parties égales d'acides propionique et formique.

Pouvoir pathogène : Son existence dans le pus d'une cellulite jugale

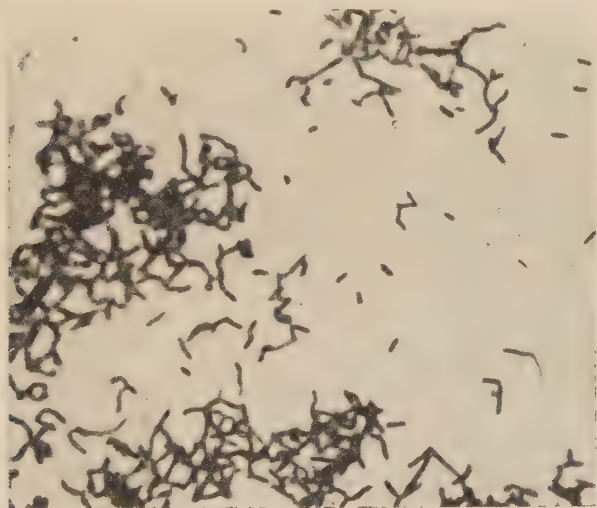


FIG. 4. — *Actinobacterium cellulitis*. Photo Manigault.

d'origine dentaire probable nous incite à poser le diagnostic d'actinomycose jugale.

On sait en effet, depuis les travaux de Lacronique, Prévot, Béal et Goudaert (3) que l'actinomycose cervico-faciale, jadis considérée comme due au seul *Actinomyces bovis*, puis à *Actinobacterium israeli*, peut être causée par d'autres Actinomycétales, puisque ces auteurs ont observé 2 cas provoqués par *Actinobacterium abscessus*.

L'existence d'une espèce nouvelle dans le cas présent amplifie la notion de pluralité étiologique des actinomycoses cervico-faciales humaines. Expérimentalement, les cultures de notre souche, n'avaient aucun pouvoir pathogène ; par la méthode de Grooten (injection intrapéritonéale au cobaye d'une culture en gélose profonde) on ne provoque aucune lésion précoce ni tardive.

(3) LACRONIQUE, PRÉVOT, BÉAL et GOUDAERT, *Rev. Stomat.*, 1948, p. 421.

Position dans la systématique: On connaissait jusqu'ici trois espèces anaérobies du genre *Actinobacterium* : *A. israeli*, *A. meyeri* et *A. abscessus*. Ces trois espèces ne sont pas gazogènes. La nouvelle espèce décrite ici étant gazogène, elle se distingue foncièrement des précédentes et le genre *Actinobacterium* se divisera désormais en deux groupes : le premier comprenant les trois espèces non gazogènes sus-dites et le second comprenant la nouvelle espèce gazogène : *Actinobacterium cellulitis* n. sp.

Nous remercions très vivement le Dr A.-R. Prévot, chef du Service des Anaérobies, qui nous a guidé dans cette étude.

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies.)

LES STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES DANS LES SELLES DES NOURRISSONS NORMAUX

par R. BUTTIAUX et J. PIERRET.

Pour apprécier le rôle des staphylocoques pathogènes dans l'étiologie de la gastro-entérite infantile, il est nécessaire de préciser leur fréquence dans les selles des nourrissons sains. Nous les avons donc recherchés par coproculture chez 83 nouveau-nés, depuis leur naissance jusque dix jours après celle-ci. Ces sujets provenaient de deux maternités (50 dans celle dite « I », 33 dans l'autre, dite « II »).

Technique. — Nous prélevons dans un tube stérile la partie centrale de la selle recueillie le plus aseptiquement possible ; 0,75 g. du prélèvement est émulsionné dans 10 cm³ d'eau physiologique. Nous en ensemençons 0,3 cm³ (soit 0,025 mg. de selles) sur une boîte de Petri contenant une gélose mannitée à 75 p. 1.000 de ClNa (milieu de Chapman) selon une technique décrite antérieurement (1). Après quarante-huit heures d'incubation à 30°, les colonies pigmentées ou non sont repiquées sur gélose lactosée à 75 p. 1.000 de ClNa. Nous recherchons sur les cultures ainsi obtenues : la coagulase, la fermentation de la mannite, le comportement sur milieu au cristal-violet (2), les hémolysines α et β selon la technique de Williams et Harper (3), c'est-à-dire par culture sur gélose au sang de mouton avec incubation de trente-six heures à 37° en atmosphère contenant 30 p. 100 de CO₂ et séjour ultérieur de dix-huit heures à + 4°.

Nous ne considérons comme pathogènes que les staphylocoques coagulant le plasma et hémolytiques. Toutes les souches isolées à coagulase + fermentaient rapidement et énergiquement la mannite ; toutes étaient hémolytiques : les hémolysines étaient du type α sauf pour quatre où elles étaient du type β . Le test du violet de gentiane nous paraît d'un intérêt réduit (4) : de nombreux staphylocoques sans coagu-

(1) R. BUTTIAUX et R. BROGNIART, *Ces Annales*, 1947, **73**, 830.

(2) G. H. CHAPMAN, *J. Bact.*, 1936, **32** (2), 199.

(3) R. E. O. WILLIAMS et G. J. HARPER, *J. Path. Bact.*, 1947, **59**, 69.

(4) J. T. BOE, *Acta Path. Microb. Scand.*, 1944, **24**, 721.

lase fournissent des colonies violettes ; par contre, nous avons observé des souches coagulant rapidement le plasma, très pigmentées, fermentant la mannite, qui donnaient des colonies non teintées par le violet de gentiane ; ces germes paraissent d'origine bovine ; nous en poursuivons l'étude.

I. *Méconium*. — Nous avons examiné 32 méconiums recueillis aussitôt après la naissance, avant toute absorption alimentaire ; 27 étaient stériles, il s'agissait d'accouchements normaux ; 5 contenaient du staphylocoque pathogène, ils provenaient d'accouchements difficiles avec application de forceps. Ceci n'est pas constant, car dans 4 autres cas semblables, le méconium était stérile.

II. *Selles des vingt-quatre premières heures*. — Au cours de celles-ci, le nourrisson a pris un repas de lait maternel, le plus souvent, ou de lait artificiel.

A la maternité I, 41 des 50 nouveau-nés (82 p. 100) présentaient du staphylocoque pathogène dans leurs fèces. A la maternité II, 30 selles sur 33 étaient infestées par ces mêmes germes (90 p. 100).

Donc, dès les vingt-quatre premières heures, les selles des nourrissons normaux contiennent des staphylocoques pathogènes. Ils y sont, soit nombreux (25,3 p. 100), soit rares (31,3 p. 100).

III. *Selles émises les jours suivants*. — La lecture du tableau ci-dessous montre que la fréquence du staphylocoque fécal pathogène augmente durant les deuxième et troisième jours de la vie et s'accroît plus lentement ensuite :

	83 SELLES ÉMISES			
	après 24 heures	après 48 heures	après 72 heures	après 10 jours
Pas de staphylocoques pathogènes.	36 (43,3 p. 100)	24 (28,9 p. 100)	18 (21,6 p. 100)	16 (19,3 p. 100)
Staphylocoques pathogènes rares	26 (31,3 p. 100)	34 (40,9 p. 100)	35 (42,1 p. 100)	20 (24 p. 100)
Staphylocoques pathogènes nombreux ou très nom- breux	21 (25,3 p. 100)	25 (30,1 p. 100)	30 (36,1 p. 100)	47 (56,6 p. 100)

19 p. 100 seulement des selles émises dix jours après la naissance ne contiennent pas de staphylocoque pathogène.

Nos résultats concordent avec ceux de Duncan et Walker, qui ont trouvé ce germe dans 75 p. 100 des 451 selles provenant de 82 nourrissons âgés de un à quinze jours (5).

L'élimination fécale du staphylocoque pathogène est constante dans les jours et mois qui suivent leur première apparition. Chez nos 83 sujets, il en était ainsi dans 86,7 p. 100 des cas. Chez les 13,3 p. 100

(5) J. T. DUNCAN et J. J. WALKER, *J. Hyg.*, 1942, 42, 474.

restants, le germe disparaissait durant un, deux ou trois jours pour réapparaître ensuite.

Sur un nombre plus restreint de sujets, nous avons précisé l'influence de l'âge sur la persistance de ces germes :

a) De deux à six mois (alimentation lactée exclusive) : chez 22 enfants sains, nous les trouvons dans 100 p. 100 des cas. Ils sont très abondants et éliminés de façon constante.

b) De six à douze mois (alimentation mixte avec prédominance du lait) : pour 32 sujets sains, nous avons isolé du staphylocoque pathogène dans les selles de 15 d'entre eux (46,8 p. 100) et n'en avons pas trouvé au cours d'examens répétés chez 17 (53,2 p. 100).

c) De deux à quatre ans (alimentation mixte avec un peu ou très peu de lait) : 15 enfants examinés n'avaient plus du tout de staphylocoque pathogène dans leurs selles. Chez l'un d'eux, ce germe a cependant pu être isolé dans l'une des 10 coprocultures quotidiennes.

d) Chez l'adolescent et l'adulte : dans 277 examens de selles de sujets différents, nous n'avons trouvé du staphylocoque pathogène que dans 18 p. 100 des cas. Il y est rare, le plus souvent.

Conclusions. — Les selles du nourrisson contiennent du staphylocoque pathogène dans 80 p. 100 des cas environ. Ces germes sont parmi les premiers à envahir le tractus digestif du nouveau-né. Ils sont parfaitement bien tolérés par les porteurs et ne déterminent aucun trouble gastro-intestinal. Ils disparaissent en même temps que l'alimentation contient de moins en moins de lait. Ils ne se retrouvent plus que chez 18 p. 100 des adolescents ou adultes ; dans ces cas, d'ailleurs, l'expérience montre qu'ils peuvent être responsables de syndromes intestinaux infectieux.

(Institut Pasteur de Lille. Laboratoire d'Hygiène expérimentale.)

ORIGINE DES STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES FÉCAUX DES NOURRISSONS NORMAUX

par R. BUTTIAUX et J. PIERRET.

Dans une note antérieure (1) nous avons signalé que 80 p. 100 des selles de nourrissons sains contenaient des staphylocoques pathogènes. Nous avons recherché l'origine de ces contaminations, en examinant :

1° Les prélèvements vaginaux maternels au cours du travail.

Cette recherche a été possible au cours de 34 accouchements. Un staphylocoque pathogène a été isolé dans 6 d'entre eux (17,6 p. 100). Le rhino-pharynx et les selles des 6 nourrissons correspondants contenaient un staphylocoque analogue dans les vingt-quatre premières heures de la vie [identification faite par la méthode du phage-typing de Wilson et Atkinson] (2). Dans ces cas, la contamination s'est produite durant l'accouchement.

(1) R. BUTTIAUX et J. PIERRET, *Ces Annales*, 1949, **76**, 488.

(2) G. S. WILSON et J. D. ATKINSON, *Lancet*, 1945, p. 647.

2° Les prélèvements rhino-pharyngés des nouveau-nés.

L'examen a été accepté par la famille dans 56 cas ; 37 (63,7 p. 100) contenaient du staphylocoque pathogène. Mais les 56 selles étaient contaminées par ce germe, 55 fois (96,6 p. 100). Il n'y a pas relation constante entre l'infection du rhino-pharynx et celle des fèces. On admet que les staphylocoques du rhino-pharynx infantile proviennent de porteurs du voisinage. Nous signalerons que dans la maternité où ont été réalisées nos recherches, nous n'avons isolé de staphylocoque pathogène que dans 7 rhino-pharynx de mères en contact constant avec leurs enfants, sur 29 examens, soit dans 24 p. 100 des cas.

Si l'on retient la contamination des voies digestives du nouveau-né au cours du travail, si l'on admet *a priori* le rôle prépondérant des infections rhino-pharyngées, il reste cependant un nombre élevé de cas où l'origine des staphylocoques fécaux n'est pas expliquée.

3° Les laits maternels ou animaux absorbés par le nouveau-né.

Nous avons recherché le staphylocoque dans ces produits selon une technique signalée antérieurement (3). Duncan (4) a montré que les laits maternels examinés par lui contenaient du staphylocoque pathogène dans 92,7 p. 100 des cas. Sur 56 laits maternels prélevés aseptiquement, nous avons trouvé ces germes 46 fois (82 p. 100).

Cette contamination, dans nos observations, a toujours été bien tolérée par la mère ; son origine encore discutée sera l'objet de travaux ultérieurs. Duncan (4) l'estime secondaire à la contamination du rhino-pharynx du nourrisson quiensemencerait les mamelons au cours des tétées ; il admet aussi qu'elle peut être due à des porteurs du voisinage des nourrices. Nous remarquerons cependant que sur 22 prélèvements effectués sur la surface des mamelons et de l'aréole des seins de nourrices ayant du staphylocoque pathogène dans leur lait, nous n'avons isolé ce germe que 5 fois (22,7 p. 100). Il semble hébergé au seul niveau des canaux galactophores.

Tout nourrisson ingérant un lait maternel contaminé par un staphylocoque pathogène présente ce germe dans les selles.

Nous avons vérifié ce fait dans 100 p. 100 des cas, chez les 46 enfants nourris par les 46 mères signalées ci-dessus. Chez 10 nourrissons absorbant un lait maternel sans staphylocoque pathogène, nous ne trouvons ce microbe que dans un seul cas, et ne l'isolons pas chez les 9 autres (90 p. 100).

Dans les deux maternités étudiées, 8 enfants ont reçu un allaitement artificiel pur. Dans un établissement, le lait ne contenait pas de staphylocoque pathogène. *Les 3 nourrissons nourris avec lui n'ont pas eu de staphylocoque pathogène dans leurs selles durant les dix premiers jours de leur vie.* Dans l'autre maternité, le lait était souillé par un porteur de germes et contenait ce germe. *Les 5 nourrissons qui l'ont absorbé avaient un germe identique dans leurs selles.*

Conclusions. — Les nourrissons soumis à l'allaitement maternel ou artificiel avec un lait exempt de staphylocoque pathogène éliminent des selles ne contenant pas ce germe, pendant les dix premiers jours de leur vie.

L'origine des staphylocoques fécaux chez le nouveau-né semble sur-

(3) R. BUTTIAUX et R. BROGNIART, *Ces Annales*, 1947, 73, 830.

(4) J. T. DUNCAN et J. J. WALKER, *J. Hyg.*, 1942, 42, 474

tout alimentaire. Il est exact cependant que l'infection au cours du travail ou celle du rhino-pharynx ont un rôle certain. Des conclusions définitives ne pourront être posées qu'après identification sérologique ou par l'emploi des bactériophages spécifiques des souches isolées. Les premiers résultats ainsi obtenus confirment les observations que nous venons de rapporter.

(Institut Pasteur de Lille. Laboratoire d'Hygiène expérimentale.)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

Position dans la systématique des nouveaux types toxogènes E et F du groupe « *Welchia perfringens*-*Welchia agni* », par A.-R. PRÉVOT.

Caractères physiques des anticorps et nature de l'antigène (anti-exotoxine, anti-endotoxine), par G. SANDOR.

ERRATUM

Ces *Annales*, 1949, t. 76, p. 294 : XIV^e Congrès international de Médecine vétérinaire, 5^e ligne : *Au lieu de* : « Membres, 24 Livres », *lire* : « Membres, 4 Livres ».

Le Gérant : G. MASSON.